DIE BIOLOGISCHE WIRKUNG VON PROTEIN I AUS DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI SOWIE SEINER SPALTSTÜCKE AUF LEUKOZYTEN VERSCHIEDENER MÄUSESTÄMME

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

KARIN STÄB

geb. Mieth

aus Stuttgart

1983

UNIV. LEIDEN BIBL.
Digitized by the Internet Archive
in 2026
https://archive.org/details/IA41547612_0070

DIE BIOLOGISCHE WIRKUNG VON PROTEIN I AUS DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI SOWIE SEINER SPALTSTÜCKE AUF LEUKOZYTEN VERSCHIEDENER MÄUSESTÄMME

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

KARIN STÄB

geb. Mieth

aus Stuttgart

1983

Tag der mündlichen Prüfung:	21. April 1983
Dekan:	Prof. Dr. K.P. Hadeler
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W.G. Bessler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Braun

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie II, der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W.G. Bessler durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W.G. Bessler für die Überlassung des Themas, die jederzeit großzügige Unterstützung und die wertvollen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. V. Braun danke ich vielmals für sein Interesse und die bereitwillige Überlassung der apparativen Einrichtungen am Lehrstuhl.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Immunologie, die durch ihr kollegiales Verhalten eine Atmosphäre guter Zusammenarbeit geschaffen und dadurch einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen der vorliegenden Arbeit geleistet haben. Für ihre wertvollen Diskussionsbeiträge, Anregungen und kooperative Zusammenarbeit danke ich vor allem Frau S. Köhl, Herrn Dr. R.B. Johnson und Herrn Dr. W. Scheuer.

Meinem Mann F. Stäb möchte ich herzlich für seine hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Absorption
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Acrylamidstocklösung
BCGF	B cell growth factor
BSA	Rinderserumalbumin
Con A	Concanavalin A
cpm	counts per minute
CSF	Colony stimulating factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Ig G	Immunoglobulin G
Ig M	Immunoglobulin M
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
LPS	Lipopolysaccharid
MEM	Minimal essential medium
MW	Molekulargewicht
PBS	Phosphate buffered saline
PHA	Phytohämagglutinin
PPD	Purified Protein Derivative
SBA	Sojabohnenagglutinin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGP	Sammelgelpuffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TGP	Trenngelpuffer
TNP	2,4,6,-Trinitrobenzolsulfonsäure
TRF	T cell replacing factor
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethan

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
Abkürzungsverzeichnis		
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Zielsetzung und Problemstellung	8
2.	MATERIAL	1o
2.1.1.	Chemikalien	1o
2.1.2.	Geräte	12
2.2.	METHODEN	13
2.2.1.	Proteinbestimmung nach Bradford	13
2.2.2.	SDS-Bestimmung mit Methylenblau	13
2.2.3.	Polyacrylamidgelelektrophorese	14
2.2.3.1.	Färbung von Gelen mit Coomassie Brillant Blue	16
2.2.3.2.	Färbung von Gelen mit Silbernitrat	16
2.2.4.	Herstellung von Antiseren	17
2.2.4.1.	Immunisierung von Kaninchen	17
2.2.4.2.	Immunisierung von Mäusen	17
2.2.4.3.	Gewinnung der Antiseren	18
2.2.5.	Immundiffusion nach Ouchterlony	18
2.2.6.	Radialer Immundiffusionstest nach Mancini	18
2.2.7.	Hämagglutinationstest	19
2.2.8.	Immunpräzipitation	19
2.2.9.	FITC-Markierung von Antiseren	2o
2.2.1o.	Fluoreszenzmarkierung von Zellen	2o
2.3.	Methoden zur Darstellung und Reinigung der Mitogene	2o 2o
2.3.1.	Bakterienkulturen	2o
2.3.1.1.	Aufschluß der Bakterien mit Glasperlen	21
2.3.1.2.	Aufschluß der Bakterien mit einer "French Press Apparatur"	21
2.3.2.	Anreicherung von Protein I	22
2.3.3.	Gelchromatographie	23
2.3.3.1.	Aufbereitung des Säulenmaterials	23
2.3.3.2.	Durchführung der Säulenchromatographie	23

UNIV. LIBRARY KIEL

		Seite
2.3.4.	Spaltung von Protein I	23
2.3.4.1.	Citraconylierung von Proteinen	24
2.3.4.2.	Gelfiltration der CNBr-Fragmente von Protein I	24
2.3.4.3.	Trypsinverdauung eines CNBr-Fragments von Protein I	25
2.4.	Methoden zur Untersuchung der biologischen Wirkung der Mitogene auf Leukozyten	25
2.4.1.	Stimulationsexperimente in vitro	25
2.4.1.1.	Präparation der Lymphozyten	25
2.4.1.2.	Präparation der Thymozyten	26
2.4.1.3.	Vorbereitung der Mitogene	26
2.4.1.4.	Lymphozytenstimulationstest	26
2.4.1.5.	Abtrennung von adhärenten Zellen	27
2.4.1.5.1.	Abtrennung von Makrophagen durch Adhärenz an Plastik-Petrischalen	27
2.4.1.5.2.	Abtrennung von adhärenten Zellen durch Chromatographie über Sephadex G 1o	27
2.4.1.6.	Trennung von B- und T-Lymphozyten	28
2.4.1.6.1.	Trennung von B- und T-Lymphozyten mit Anti-Theta-, Anti-Immunoglobulin-Seren und Komplement	28
2.4.1.6.2.	Trennung von B- und T-Lymphozyten mit Sojabohnenagglutinin	28
2.4.1.6.3.	Trennung von B- und T-Lymphozyten mit Hilfe einer Nylon-Wolle-Säule	29
2.4.2.	Untersuchung der Antikörperproduktion von B-Lymphozyten nach Stimulation mit Mitogenen	3o
2.4.2.1.	Hämolytischer Plaque-Test mit TNP-beschichteten Erythrozyten	3o
2.4.2.2.	Hämolytischer Plaque-Test mit Protein A-beschichteten Erythrozyten	31
3.	ERGEBNISSE	33
3.1.	Darstellung und Reinigung von Protein I	33
3.1.1.	Gelfiltration von Protein I	35
3.1.2.	Immunpräzipitation von Protein I	37

		Seite
3.2.	CNBr-Spaltung von Protein I und Trennung der Spaltstücke	38
3.3.	Ergebnisse zur Untersuchung der biologischen Wirkung der Mitogene auf Leukozyten	41
3.3.1.	Untersuchung der Stimulation von Milzzellen unter Einwirkung von Protein I und Fragmenten von Protein I	41
3.3.1.1.	Zeit-Abhängigkeit der Stimulation von Milzlymphozyten mit Protein I und CNBr 1	41
3.3.1.2.	Dosis-Abhängigkeit von verschiedenen Protein I-Präparaten und dem CNBr 1-Fragment bei der Stimulation von Milzzellen aus C3H/HeJ-Mäusen	43
3.3.1.3.	Dosis-Abhängigkeit von Protein I und seiner Fragmente bei der Stimulation von Milzzellen aus Balb/c Mäusen	43
3.3.1.4.	Einfluß von Anti-Protein I-Seren bzw. Anti-CNBr1-Seren auf die Stimulation von Milzlymphozyten	49
3.3.1.5.	Dosis-Abhängigkeit von Protein I und Protein I-Fragmenten bei der Stimulation von Milzzellen aus "nackten" Mäusen	51
3.3.1.6.	Stimulation von Thymozyten	51
3.3.2.	Untersuchung der Stimulation von getrennten Lymphozytenpopulationen unter Einwirkung von Protein I und Fragmenten von Protein I	53
3.3.2.1.	Stimulation nach Entfernen von Makrophagen durch Adhärenz an Plastik	53
3.3.2.2.	Stimulation nach Entfernen von adhärenten Zellen durch Chromatographie über Sephadex G 1o	58
3.3.2.3.	Stimulation von mit SBA getrennten Lymphozyten	61
3.3.2.4.	Stimulation von mit Nylonwolle getrennten Lymphozyten	63
3.3.3.	Untersuchung der Antikörpersekreteion von B-Lymphozyten nach Einwirkung von Protein I bzw. seiner Fragmente	65

		Seite
3.3.3.1.	Zeitabhängigkeit nach Stimulation in vitro	65
3.3.3.2.	Dosis-Abhängigkeit nach Stimulation in vitro	66
3.3.3.3.	Antikörpersekretion nach Stimulation in vivo	66
4.	DISKUSSION	72
5.	ZUSAMMENFASSUNG	84
6.	LITERATURVERZEICHNIS	86

1. EINLEITUNG

Die Zellwand gram-positiver Bakterien setzt sich aus einer Plasmamembran mit Polysacchariden und Lipoteichonsäuren und einem mehrschichtigen Mureinsacculus zusammen. Gram-negative Bakterien haben ebenfalls eine Plasmamembran, die im Aufbau dem "fluid mosaic model" (1,2) entspricht, besitzen jedoch noch eine zusätzliche äußere Membran, welche einen einschichtigen Mureinsacculus umgibt. In der äußeren Membran gram-negativer Bakterien sind Systeme für den aktiven Transport, die oxidative Phosphorylierung und die Biosynthese von einigen Makromolekülen lokalisiert. Beide Membranen sind 75 Å dick und liegen 1oo Å auseinander (3). Die äußere Membran ist der Plasmamembran morphologisch sehr ähnlich, enthält jedoch weniger Phospholipide, weniger Proteine, aber dafür eine einheitliche Kohlehydratkomponente, das Lipopolysaccharid (LPS). In einer Salmonella typhimurium-Zelle befinden sich beispielsweise ungefähr 2,5 x $1o^6$ LPS-Moleküle (4), die etwa 45 % der Oberfläche der äußeren Membran ausmachen. Die Phospholipide enthalten vor allem Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylglycerin und Cardiolipin (4). In ihrer Funktionsweise ist die äußere Membran sehr verschieden (5) gegenüber der Plasmamembran. Sie verfügt über eine größere Permeabilität als andere Membranen und dient als Träger von Oberflächenantigenen und Rezeptoren. In ihrer Funktion als Molekularsieb erlaubt die äußere Membran die Diffusion von Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von 8oo. Die Diffusionsporen werden von Matrixproteinen (z.B. Protein I) ge-

bildet. Außerdem enthält die äußere Bakterienmembran noch spezifische Transportproteine für Nährstoffe, welche zu groß sind, um die Poren zu passieren, z.B. Vitamin B_{12}, Nukleoside, Maltose Oligosaccharide oder Fe^{2+}Chelate. Die meisten dieser Proteine dienen zusätzlich als Rezeptoren für Phagen und Colizine.

Die äußere Membran enthält nur wenige verschiedene Proteine, z. B. Protein I, Protein II*, Protein III, Protein IV, Tol G-Protein und Lipoprotein, die jedoch in relativ großen Mengen vorhanden sind. Mit ihrer Isolierung und Charakterisierung haben sich bereits mehrere Arbeitsgruppen beschäftigt (6,7,8,9,1o,11,12). In dieser Arbeit sollen Lipoprotein und Protein I von Escherichia coli näher betrachtet werden. Lipoprotein (Molekulargewicht 7.5oo) setzt sich aus 58 Aminosäuren und einem Lipid zusammen. Am N-terminalen Ende des Proteins sind zwei Fettsäuren als Diglycerid gebunden und eine dritte Fettsäure amidartig an Cystein. Mit dem C-terminalen Lysinrest ist das Lipoprotein über einen Diaminopimelinsäurerest kovalent an den Mureinsacculus gebunden (13,14, 15,16,17). Inouye und Mitarbeiter wiesen in Escherichia coli nach, daß das Lipoprotein nicht nur in dieser gebundenen Form, sondern auch in einer freien Form in der Bakterienzellwand vorliegt (18).

Protein I (Molekulargewicht 37.ooo) ist sehr stark, nicht kovalent an den Mureinsacculus gebunden. Es wird angenommen, daß ionische Bindungen vorliegen (5).

Protein I setzt sich aus 34o Aminosäuren zusammen und enthält keine Nicht-Protein-Anteile (6,7). Es ist sehr hydrophob und hat einen extrem hohen Anteil an Beta-Faltblatt-Strukturen (6). Pro Bakterium findet man ungefähr $1{,}1 \times 1o^5$ Protein I-Moleküle, die 6o % der äußeren Oberfläche des Mureinsacculus bedecken (19). Protein I ist in der äußeren Membran sehr regelmäßig angeordnet und bildet in trimerer Form passive Poren, die eine schnelle Diffusion von niedermolekularen hydrophilen Molekülen erlauben (19,2o,21,22).

Die Mehrzahl der Bakterien ist zu einer heterotrophen Lebensweise befähigt, und zwar saprophytisch oder parasitisch (selten obligat) in oder auf pflanzlichen, tierischen oder menschlichen Wirten (1). Aufgrund dieser Allgegenwärtigkeit von Bakterien haben Tier und Mensch eine Vielzahl von Abwehrmechanismen gegen bakterielle Infektionen entwickelt (23), die vor allem gegen pathogene Bakterienstämme gerichtet sind. Letztere können unter anderem über Nase, Mund, Haut, den Magen-Darmtrakt und den Urogenitaltrakt in den Körper eindringen. Sie können durch unspezifische mechanische oder chemische Faktoren (z. B. Tränenflüssigkeit, Schleim, pH-Wert, Lysozym) abgewehrt werden. Weiterhin können eindringende Bakterien durch Komplementlyse, Phagozytose oder durch spezifische zelluläre und humorale Immunreaktionen unschädlich gemacht werden.

Das Komplementsystem, dem in der Frühphase der Abwehr mikrobieller Infektionen, vor der Ausbildung spezifischer Immunreaktionen, große Bedeutung zugeschrieben wird (Aktivierung des Komplementsystems insbesondere von der C 3-Komponente aus durch bakterielle Polysaccharide und Lipopolysaccharide), ist ein aus 11 Glykoproteinen bestehendes komplexes Enzymsystem (24). Seine Aktivierung, ausgehend von C 1 oder C 3 (z. B. durch Antikörper, DNA, Proteasen, LPS u.s.w.),löst eine Kaskade von rasch aufeinanderfolgenden enzymatischen Vorgängen aus, in deren Verlauf verschiedene biologisch aktive Stoffe entstehen (24). Dies führt letztendes durch Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplement-Komplexes mit spezifischen Antikörpern zur Lyse der Bakterien (spezifischer Abwehrmechanismus) oder durch Auslösen entzündlicher Reaktionen (C 3b), durch Chemotaxis und Begünstigung der Immunadhärenz von immunkompetenten polymorphkernigen Leukozyten (unspezifischer Abwehrmechanismus). Bei einem Teil der immunkompetenten Zellen konnten Oberflächenrezeptoren für Antigen-Komplement- oder für Antigen-Antikörper-Komplexe nachgewiesen werden (24). Durch Besetzung von Fremdkörpern mit sogenannten Opsoninen (C 3b-Komponente des Komplementsystems oder Antikörper) kann die Phagozytose dieser Fremdkörper durch Gewebsmakrophagen und Monozyten wesentlich verstärkt werden (25). Als Abwehr gegen das Eindringen von körperfremdem Material ist die Phagozytose und intrazelluläre Verdauung das in der Evolution älteste System, das lange vor dem Auftreten von spezifischen Immunreaktionen durch Lymphozyten ausgebildet war. Bei der Phagozytose umfließt das Plasma des Makrophagen den Fremdkörper vollständig, bis er als "Phagosom" durch das Plasma des Makrophagen eingeschlossen ist. Das Phagosom verschmilzt mit den vorhandenen Lysosomen, die mit Verdauungsenzymen angefüllt sind. Das phagozytierte Material wird von den Makrophagen teilweise in immunogener Form auf der Oberfläche präsentiert oder ins Medium abgegeben und so den Lymphozyten zur Antigenerkennung

dargeboten. Erst dadurch können spezifische, zellvermittelte oder humorale Immunreaktionen ausgelöst werden.
An spezifischen Immunreaktionen sind in der Hauptsache drei Zellpopulationen beteiligt, nämlich Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Die humorale Immunabwehr beruht auf der Bildung von spezifischen Antikörpern, die gegen eine bestimmte antigene Determinante auf einer als fremd erkannten Struktur (z. B. Bakterium) gerichtet sind und das Antigen neutralisieren (Aktivierung von Komplement, Phagozytose). Die zellvermittelten Immunreaktionen spielen vor allem bei der Abwehr und Vernichtung intrazellulärer Parasiten wie Mykobakterien, Viren, Protozoen usw. eine wichtige Rolle (26). Bei humoralen Immunreaktionen ist eine Kooperation der drei Zelltypen Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten unumgänglich, wobei die Makrophagen eine Schlüsselrolle einnehmen. Wie bereits erwähnt, fällt ihnen neben der Phagozytose auch die Aufgabe der Präsentierung von Antigen in immunogener Form auf der Zelloberfläche zu (27). Die Arbeiten von Mitchisson, Schmitdke et al. und Spitznagel et al. (28, 29,3o) zeigen, daß verschiedene Antigene an Makrophagen gebunden, wesentlich immunogener sind, als lösliche Antigene allein. Die Funktion der Bindung und Präsentierung von Antigenen ist genetisch restringiert und wird nur von Ia-positiven Zellen erfüllt (31).
Eine weitere Funktion von Makrophagen ist die Sekretion von löslichen Faktoren. Man muß hierbei zwischen Substanzen unterscheiden, die ständig produziert werden (z. B. Komplement-Proteine, neutrale Proteasen, Interferon, Lysozym) und zwischen Substanzen, die ausschließlich nach Aufnahme von Partikeln sezerniert werden. Letztere werden als Lymphokine bezeichnet. Makrophagen produzieren ein Lymphokin mit einem Molekulargewicht von 15.ooo, das Interleukin 1 (IL-1). Es ist ein nicht-antigen-spezifisches Peptid (32), das T-Lymphozyten aktiviert. Es versetzt sie in die Lage, auf Antigene oder auf sekundäre Mediatoren zu antworten (31).

Die Hauptaufgabe von Interleukin 1 ist es, T-Lymphozyten zur Sekretion des Lymphokins Interleukin 2 zu veranlassen (33,34,35). Interleukin 2 hat ein Molekulargewicht von 3o.ooo bis 35.ooo, wird von T-Zellen produziert, die Lyt 1^+2^- als Oberflächenantigen tragen und ist ein Signal für Lyt 1^-2^+-Zellen, die dadurch zur Interferonproduktion angeregt werden. Interferon spielt eine Rolle bei zellvermittelten Immunreaktionen. Außerdem aktiviert Interleukin 2 T-Helfer-Zellen, die wiederrum zur Aktivierung von B-Lymphozyten beitragen (36), oder Vorläufer von zytotoxischen T-Lymphozyten. Die T_c-Vorläufer-Zellen entwickeln sich nach engem Kontakt ihres spezifischen Oberflächenrezeptors mit einer komplementären Fremdstruktur zu einem sensibilisierten, zu zytotoxischen Effektorleistungen befähigten zytotoxischen T-Lymphozyten, welcher die Zielzelle in kurzer Zeit schädigen bzw. abtöten kann. Interleukin 2-Moleküle aus verschiedenen Spezies haben Strukturhomologien. Human IL-2 stimuliert das Wachstum von Mäuse-T-Lymphozyten, während IL-2 aus Mäusen humane T-Lymphozyten nicht stimulieren kann. Es wird vermutet, daß die Rezeptoren für IL-2 von Spezies zu Spezies verschieden sind (37).
Es gibt noch weitere Lymphokine, die Einfluß auf die Entwicklung und Aktivierung von B-Lymphozyten haben. Dazu gehören der Colony stimulating factor (CSF), der B cell growth factor (BCGF) und der T cell replacing factor (TRF). CSF aktiviert Makrophagen und regt sie zur Produktion von Interleukin 1 an (38). Er wird von Lyt 1^+2^- T-Lymphozyten produziert. BCGF wird ebenfalls von T-Zellen produziert, regt aber die Proliferation von B-Lymphozyten an (39). Vom TRF, der von Lyt $1^+2^-3^-$-Zellen produziert wird, nimmt man an, daß er ein Signal für antigen-stimulierte und proliferierende B-Lymphozyten darstellt und diese zur Differenzierung zu antikörper-sezernierenden Plasmazellen veranlaßt (4o)

B-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche Immunoglobuline, die als Rezeptoren für Antigene dienen. Gemäß der klonalen Selektionstheorie (41) exprimiert ein Lymphozyt auf seiner Oberfläche nur eine antigen-bindende Spezifität, die genetisch festgelegt ist (42) und deren Vielfalt durch die These einer somatischen Mutation erklärt werden kann (43). Die Bindung von Antigenen an die Oberflächenimmunoglobuline von B-Lymphozyten zusammen mit antigenaktivierten T-Helfer-Zellen und Lymphokinen führen zu einer Proliferation der B-Lymphozyten und zu einer Differenzierung zu antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Es müssen dazu zusätzlich Rezeptoren für die benötigten Lymphokine auf der Oberfläche der B-Lymphozyten vorhanden sein. Die Kooperation zwischen B-Lymphozyten und T-Helfer-Zellen ist außerdem genetisch restringiert (42).
Es gibt aber auch die Möglichkeit einer polyklonalen Aktivierung von B-Lymphozyten durch Mitogene, wozu keine direkte Kooperation mit T-Helfer-Zellen nötig ist. Diese können den Antigen-Bindungsschritt an oberflächengebundene Antikörpermoleküle von B-Lymphozyten und deren spezifische Interaktion mit den antigenen Determinanten, die für eine monoklonale Aktivierung der B-Lymphozyten verantwortlich ist, umgehen (42). Polyklonale B-Zell-Aktivatoren und Mitogene sind bei der Analyse der Lymphozyten-Aktivierungs- und Differenzierungsmechanismen sehr nützlich und wurden daher bereits von vielen Arbeitsgruppen untersucht. Für in vitro Untersuchungen ist die Verwendung von Antigenen zur Stimulation weniger geeignet, da durch sie jeweils nur ein Klon und damit nur ein minimaler Bruchteil der B-Lymphozytenpopulation angeregt werden kann, wohingegen bei mitogener Stimulation bis zu 3o% aller B-Zellen Veränderungen erfahren.
Mitogene sind Substanzen, die Blasten-Transformation induzieren, DNA-Synthese und Zellteilung. Die meisten B-Zell-Mitogene sind auch in der Lage, Differenzierung von Lymphozyten zu induzieren, was in der Synthese und Sekretion von polyklonalen Antikörpern resultiert (44).

B-Lymphozyten müssen die Stimuli der Mitogene über einen Mitogenrezeptor erhalten, der aber nicht den oberflächengebundenen Antikörpermolekülen entspricht. Das geht aus Untersuchungen an C3H/HeJ Mäusen hervor, die aufgrund eines genetischen Defekts nicht auf LPS antworten können, wohl aber auf Lipoprotein, PPD oder T-Zell-abhängige Antigene (42). Bei der mitogenen Stimulation teilen sich über 9o% aller replikation-induzierbaren B-Lymphozyten in den ersten 18 Stunden. Jeder dritte B-Lymphozyt aus verschiedenen Mäusestämmen (6-12 Wochen alt) wird zur klonalen Replikation und Ig M-Sekretion stimuliert (45). Das Mitogen wird nach jedem kompletten Zellzyklus benötigt, innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Mitose und zwar in der G1-Phase, um den nächsten Zellzyklus einzuleiten. Bei 1o% aller mitogen-stimulierten B-Zell-Klonen findet ein "Switch" von Ig M zu Ig G_{1+2} statt (46).
Die Mehrzahl an Bakterien und bakteriellen Produkten (z.B. LPS und Lipoprotein) stimulieren B-Lymphozyten, während Pflanzenmitogene (z. B. Con A, PHA) vor allem T-Lymphozyten stimulieren.

1.1. Zielsetzung und Problemstellung

Mit dem Ziel, einen näheren Einblick in die Natur der molekularen Mechanismen der Zellproliferation und -differenzierung zu gewinnen, sollten die Interaktionen des mitogenen Protein I der äußeren Membran von *Escherichia coli* mit Lymphozytenpopulationen der Mäuseinzuchtstämme Balb/c, C3H/HeJ und C3H/Tif/Bom-nu nu untersucht werden.
Protein I aus der äußeren Membran von *Escherichia coli* ist ein sehr gut charakterisiertes Molekül (Vergl. Einleitung). In dieser Arbeit sollte es aus dem Bakterienstamm *Escherichia coli* B/r nach verschiedenen Methoden (6,48,49) isoliert und gereinigt werden, um eine Möglichkeit zu finden, das Protein in größeren Mengen zu gewinnen.

Mit Hilfe bekannter Charakterisierungsmethoden (5o,51,52, 53,54,55,56,57) sollte außerdem die Reinheit der verschiedenen Protein I-Präparate bestimmt und verglichen werden.
Um die für die Mitogenität verantwortlichen Strukturkomponenten des Protein I-Moleküls zu ermitteln, sollte es mit CNBr bzw. mit Trypsin in kleinere Fragmente zerlegt werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die biologischen Eigenschaften dieser Fragmente im Vergleich zu den Eigenschaften des gesamten Protein I-Moleküls zu untersuchen. Hierzu wurden Stimulationsexperimente mit Milzlymphozyten durchgeführt und die Induktion der Antikörpersekretion von B-Lymphozyten durch Protein I bzw. seine Fragmente verglichen.
In einem weiteren Teil der Arbeit sollte die durch Protein I induzierte Stimulation von Lymphozyten mit Hilfe serologischer Testmethoden näher untersucht werden. Für Con A konnte gezeigt werden, daß die mitogene Stimulation von T-Lymphozyten durch Zugabe eines Anti-Con A-Serums spezifisch inhibiert werden konnte (58). Die Möglichkeit einer Inhibition der Stimulation durch herzustellende Anti-Protein I-Seren sollte überprüft werden.
In einem letzten Punkt der Arbeit sollte die biologische Wirkung von Protein I und seiner Fragmente auf getrennte Lymphozytenpopulationen und Thymozyten untersucht werden. Es wurden bereits verschiedene Möglichkeiten zur Abtrennung von Makrophagen aus einer Milzlymphozytenpopulation (59,6o) beschrieben und auch Methoden zur Trennung von B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (61,62). Diese sollten bei den hier erwähnten Untersuchungen angewandt und verglichen werden, um Einblicke in die Kooperation der verschiedenen Zellpopulationen bei einer mitogenen Stimulation zu erhalten.

2. MATERIAL

2.1.1. Chemikalien

Amersham Buchler	^{3}H-Thymidin
	^{3}H-Leucin
	^{3}H-Uridin
Behring, Marburg	Freund's komplettes Adjuvans
	Freund's inkomplettes Adjuvans
	Hammelblut
	Hämocyanin
Cedarlane	Lympholyte-M
Chroma Gesellschaft, Stuttgart	Coomassie Brillant Blue G 25o und R 25o
Flow Laboratories, Meckenheim	MEM
	Fungizone
	L-Glutamin
Gibco Europe, Karlsruhe	Meerschweinchen Komplement
	RPMI 164o
	Penicillin-Streptomycin
L'industrie Biologique Française S.A.	Indubiose Agarose A 37
LKB, Karlsruhe	Ultrogele AcA 54, 44, 34, 22
Pharmacia, Freiburg	Sephadex G 1o
	Protein A
	SBA
Pierce, Rockford	Citraconsäureanhydrid
Roth, Karlsruhe	FITC
Sigma, St. Louis	BSA
	Trypsin
	Gammaglobulin
	Cacodylsäure

Seromed, München	FCS
Serva, Heidelberg	Acrylamid
	Methylenbisacrylamid
	TEMED
	Bromphenolblau
	DTT
	Alu Gel S
	Desoxyribonuklease
	TNP

Außer den hier aufgeführten wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt verwendet.

2.1.2. Geräte

American Instrument Company, Silver Spring	Aminco French Press Apparatur
Amicon	Flüssigkeitsbehälter RA 1 mit Diaflo-Ultrafiltrationsmembran PM 1o
Bio Rad	Elektrophoreseapparatur Spannungsgerät Econo Säulen 1 x 5o cm
Braun	Labsonic 151o Ultraschallstab
Christ	Minifuge 2 CO_2-Inkubator
Dynatech Laboratories	Zellerntegerät Mash II
Falcon	Mikrotiterplatten mit Flach- und Rundboden sterile Plastikröhrchen 5ml, 1oml, 5oml sterile Pipetten 1ml, 5ml, 1oml
LKB	Fraktionskollektor mit Durchflußspektrometer
Packard	Tri-Carb-Liquid-Scintillation Counter
Vibrogen	Homogenisator
Whatman	Glasfiber-Filterstreifen 934 AH
Zeiss	Fluoreszenzmikroskop

2.2.1. Proteinbestimmung nach Bradford (53)

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf einer Farbreaktion von Coomassie Brillant Blue G 25o mit Amincgruppen des Proteins. Mit einer o,1prozentigen wässrigen BSA-Lösung wird eine Eichgerade aufgestellt (o µl, 1o µl, 2o µl, 3o µl, 4o µl und 5o µl der o,1prozentigen BSA-Lösung). Die Proben werden jeweils mit bidestilliertem Wasser auf 1oo µl aufgefüllt. Anschließend fügt man je 5 ml des Bradford Reagenzes zu und mischt die Proben (1oo mg Coomassie Blue G25o werden in 5o ml 95prozentigem Äthanol gelöst, 1oo ml 85prozentige Phosphorsäure zugefügt und auf 1 Liter mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt; die Lösung muß vor Gebrauch filtriert werden). Nach einer 1ominütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Absorption bei 595 nm in Plastikküvetten gemessen. Mit dieser Methode lassen sich Proteinmengen von 1o ug bis 5o ug in einer Probe von höchstens 1oo ul anhand der Eichgerade ermitteln.

2.2.2. SDS-Bestimmung mit Methylenblau (52)

Als Stammlösung für die SDS-Bestimmung werden 1oo ml einer o,5 prozentigen Methylenblaulösung in bidestilliertem Wasser hergestellt. Zu dieser Lösung gibt man 1/2o des Volumens Chloroform und bewahrt sie bei Raumtemperatur in einer dunklen Flasche auf.
Mit dieser Methode kann man o - 1o µg SDS pro 1oo µl Probe bestimmen. Man fertigt zunächst eine Eichkurve mit Hilfe einer SDS-Stammlösung (o,1 mg/ml SDS) an. Zu 1oo µl Probe (bekannter oder unbekannter SDS-Konzentration) gibt man 5oo µl Methylenblautestlösung. Die Methylenblautestlösung wird hergestellt, indem man die oben beschriebene

Stammlösung 1 : 1oo in o,7 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 (28 Volumenteile o,7 mM NaH_2PO_4 x H_2O und 72 Volumenteile o,7 mM Na_2HPO_4 werden gemischt) verdünnt. Anschließend gibt man in jedes Röhrchen noch 3 ml Chloroform. Es wird 6 mal im Vortex kräftig gemischt und dann 3 Minuten bei 2.ooo rpm und 4°C zentrifugiert. Die das SDS enthaltende Chloroformphase wird bei 655 nm im Spektralphotometer gemessen. Der Vorgang sollte möglichst rasch durchgeführt werden, da die Chloroformlösung sehr schnell verdunstet.

2.2.3. Polyacrylamidgelelektrophorese (54,55)

Die in dieser Arbeit beschriebenen Proteine wurden unter anderem mittels Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert. Es wurden Gradientengele mit 7,5% bis 15% Acrylamid bzw. mit 1o% bis 2o% Acrylamid verwendet.Die Gelelektrophorese wurde in einer Vertikal-Elektrophoresekammer (Fa. Bio-Rad, Vergl. 2.1.2.)durchgeführt,und das Format der Gele betrug 9,5 x 13 cm.
Stammlösungen für Polyacrylamidgelelektrophorese:
Trenngelpuffer (TGP): 1,5 M Tris/HCl pH 8,8;
o,4% SDS
Acrylamid Stocklösung (AS): 29,2 g Acrylamid +
o,8 g Methylenbisacrylamid
auf 1oo ml H_2O bidest.
Diese Lösung muß vor Gebrauch filtriert werden.
Sammelgelpuffer (SGP): o,5 M Tris/HCl pH 6,8
o,4% SDS
Das folgende Schema gibt die Zusammensetzung verschiedener im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigter Gele wieder. Zur Herstellung eines linearen Gradientengels wurden von der höher konzentrierten Acrylamidlösung 7 ml und von der niedriger konzentrierten Acrylamidlösung 6 ml benötigt. Die Lösungen wurden vor dem Gießen entgast.

Pipettierschema für Gradientengele

	7,5%	1o%	15%	2o%
TGP	5,o ml	5,o ml	2,5 ml	2,5 ml
AS	5,o ml	6,6 ml	5,4 ml	6,7 ml
H_2O	1o,o ml	8,4 ml	-	-
75% Glycerin	-	-	2,1 ml	o,8 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
1o% APS	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Pipettierschema für Polyacrylamidgele mit konstanter Acrylamidkonzentration

	1o%	15%	2o%
TGP	7,8 ml	7,8 ml	7,8 ml
AS	1o ml	15 ml	2o ml
H_2O	1o ml	5 ml	-
75% Glycerin	2 ml	2 ml	2 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
1o% APS	15 µl	15 µl	15 µl

Es wurden 13 ml Gellösung für ein Gel benötigt. Um saubere Grenzschichten zu erhalten, wurden die Polyacrylamidgele nach dem Gießen mit etwa 1 ml bidestilliertem Wasser vorsichtig überschichtet. Nach etwa 3 - 5 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Wasser mit einem Filterpapierstreifen vorsichtig entfernt und ein Sammelgel über das nun polymerisierte Trenngel gegossen. Das Sammelgel setzt sich wie folgt zusammen: 1,25 ml SGP; o,75 ml AS; 3,o ml H_2O; 5 ul TEMED und 15 µl 1o% APS. Man läßt es über Nacht bei 4^oC durchpolymerisieren. Proteinproben (1o - 1oo µg/1o µl)

wurden mit 1o µl doppelt konzentriertem Probenpuffer (o,o625 M Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 1o% Glycerin; 5% 2-Mercaptoäthanol; o,oo1% Bromphenolblau) versetzt und 5 Minuten bei 1oo°C inkubiert. Nach dem Auftragen der Proben (je 18 µl) wurden diese von der Kathode hin zur Anode in ungefähr 3,5 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 2o mA nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Als Elektrodenpuffer wurde eine wässrige Lösung von o,192 M Glycin; o,1% SDS und o,o75 M Tris/HCl pH 8,3 verwendet.

2.2.3.1. Färbung von Gelen mit Coomassie Brillant Blue (56,57)

Das Gel wird nach der Elektrophorese mindestens 2 Stunden in Färbelösung (454 ml Methanol/Wasser im Verhältnis 1 : 1; 46 ml Eisessig; 1,25 g Coomassie Brillant Blue R 25o) inkubiert. Die Färbelösung muß vor Gebrauch filtriert werden. Danach wird das Gel über 24 Stunden bei mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung (75 ml Eisessig und 5o ml Methanol pro 2 Liter Wasser) bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden entfärbt.

2.2.3.2. Färbung von Gelen mit Silbernitrat (5o,51)

Das Gel wird vorsichtig von den Glasplatten gelöst und zunächst 3o Minuten mit 5o% Methanol und 1o% Essigsäure fixiert. Danach wird es 3o Minuten in einer wässrigen Lösung, die 7% Essigsäure und 5% Methanol enthält, inkubiert und weiterhin nochmals 3o Minuten in 1o% Glutaraldehyd fixiert. Nun läßt man das Gel über Nacht in bidestilliertem Wasser quellen. Es wird danach 3o Minuten in einer DTT-Lösung (5 µg/ml) inkubiert und anschließend 3o Minuten in o,1 prozentiger Silbernitratlösung. Das Gel muß nun kurz in H_2O gewaschen werden, und im Anschluß daran gibt man den Entwickler zu (5o µl 37 prozentiger Formaldehyd in 1oo ml 3 prozentige $NaCO_3$-Lösung). Nachdem die Banden gut sichtbar geworden sind, wird die Reaktion durch Zugabe von 5 ml einer 2,3 M Zitronensäurelösung beendet. Nach 1o Minuten wird die Lösung entfernt und das Gel in Wasser aufbewahrt.

2.2.4. Herstellung von Antiseren

In dieser Arbeit wurden Antiseren vom Kaninchen und von der Maus gewonnen.

2.2.4.1. Immunisierung von Kaninchen

Protein I (1 mg/5oo µl Saline) wurde im Verhältnis 1 : 1 mit Freund's komplettem Adjuvans und 5o ul Alu Gel S (Aluminiumhydroxyd) gemischt und dem Kaninchen an mehreren Stellen des Rückens subkutan appliziert. Im Abstand von jeweils 14 Tagen wurde das Kaninchen noch 2 mal unter Verwendung von inkomplettem Freund's Adjuvans immunisiert. 1o Tage nach der letzten Immunisierung konnte das Antiserum gewonnen werden (Vergl. 2.2.4.3.).
Zur Erhöhung des Serumtiters wurde das Kaninchen nach dreimaliger Serumgewinnung im Abstand von je 2 - 3 Wochen mit an Hämocyanin gekoppeltem Protein I immunisiert. Zur Kopplung wurden 2 mg Hämocyanin mit o,2 mg Protein I in 1 ml PBS/o,1% SDS (PBS pH 7,4: 8,o g NaCl; o,2 g KH_2PO_4; 1,4 g $Na_2HPO_4 \times H_2O$; o,2 g KCl; pro Liter H_2O bidest.)vermischt und o,15% (Endkonzentration) Glutardialdehyd zugefügt. Die Mischung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur belassen und anschließend zwei mal gegen je 1ooo ml PBS/o,1% SDS dialysiert (81).

2.2.4.2. Immunisierung von Mäusen

Balb/c Mäuse wurden in Zusammenarbeit mit S. Köhl und R.B. Johnson mit Protein I und dem CNBr-Fragment (CNBr 1) von Protein I immunisiert. Je 1oo ug/2oo ul Saline wurden 6 - 1o Wochen alten Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Nach dreimaliger Wiederholung der Injektionen im Abstand von je einer Woche wurde Blut aus dem Plexus orbitalis entnommen (durchschnittlich 5oo µl pro Maus) und das Serum gewonnen.

2.2.4.3. Gewinnung der Antiseren

Zur Gewinnung von Kaninchenserum wurden dem Kaninchen aus der Ohrvene 4o - 5o ml Blut entnommen. Zur Gerinnung wurde es über Nacht bei 4°C belassen. Der Blutkuchen wurde mit einem Spatel geteilt und danach 3o Minuten bei 4°C und 1.4oo x g abzentrifugiert, das Serum vorsichtig abpipettiert, aliquotiert und bei -2o°C bzw. -7o°C eingefroren.
Zur Gewinnung des Mäuseserums wurde das Blut 3o Minuten bei Raumtemperatur und 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Blutkuchen ebenfalls abzentrifugiert und das Serum vorsichtig abpipettiert.

2.2.5. Immundiffusion nach Ouchterlony (63)

Der Diffusionstest wurde in 1% Agarose in Saline oder PBS durchgeführt. In kleine Petrischalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm wurden je 1,5 ml Agaroselösung (bei 56°C) pipettiert. Nach dem Festwerden der Agarose (2 Stunden) wurden mit einem Stempel Löcher gestanzt und diese mit Hilfe einer Pasteur-Pipette und einer Wasserstrahlpumpe sauber ausgehoben. In diese Löcher wurden das Antigen bzw. Antiserum pipettiert (6 µl). Die Präzipitation erfolgte bei 4°C in einer feuchten Kammer und wurde regelmäßig überprüft.

2.2.6. Radialer Immundiffusionstest nach Mancini (64)

Dazu wurden 1oo - 2oo µg/ml Antigen in der heißen Agaroselösung (1%) suspendiert. Bei 56°C wurden je 2 ml dieser Lösung auf Objektträger pipettiert und nach 2 Stunden Löcher ausgestanzt wie im Abschnitt 2.2.5. beschrieben. In diese gab man je 6 µl Antiserumverdünnung und inkubierte bei 4°C in einer feuchten Kammer. Der Durchmesser des entstandenen Präzipitationsrings gilt als Maß für den Serumtiter.

2.2.7. Hämagglutinationstest

Schafserythrozyten (1 ml 5% in physiol. Kochsalzlösung) wurden mit 1oo - 2oo µg des Antigens beschichtet (Vergl. 2.4.2.1 bzw. 2.4.2.2.). In eine Falcon Mikrotiterplatte mit Rundboden wurden einer 1 : 2 Verdünnungsreihe des Antiserums (25 µl pro Vertiefung) 25 µl einer 1 prozentigen Erythrozytensuspension zugefügt. Die Mikrotiterplatten wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert und im Anschluß daran über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die Agglutination konnte mit Hilfe eines Mikroskops festgestellt werden. Zur Verdeutlichung des Ergebnisses können die einzelnen Vertiefungen mit je 25 µl 1 : 1o verdünntem Meerschweinchen Komplement versetzt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert werden. Bei positiver Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt Lyse der Erythrozyten.

2.2.8. Immunpräzipitation (65)

Zu 1oo µl Antigenlösung (1 mg/ml) wurden 2o µl Antiserum gegeben und unter schütteln 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurden je 5o µl einer Protein A-Sepharose-Suspension (2 mg/ml, mindestens 24 Stunden gequollen) zugefügt und nochmals 1 Stunde bei 4°C unter schütteln inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren in der Eppendorf-Zentrifuge (2 Minuten) wurden zum Überstand 2oo µl 1o prozentige eiskalte TCA gegeben zur Fällung der Proteine und 1o Minuten bei 4°C inkubiert. Dieses Präzipitat wurde durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Das Sediment enthielt den Protein A-Sepharose-Immunkomplex und wurde 5 mal mit Waschpuffer (15o mM NaCl, 5 mM EDTA, 1o mM DTT, 5o mM Tris/HCl pH 7,4 , 2 mg/ml BSA und 2 mg/ml Gelatine) gewaschen und 2 mal mit PBS. Anschließend wurde der Immunkomplex mit 25o µl 5o mM NH_4HCO_3/ 1% SDS/ 1% 2-Mercaptoäthanol 2o Minuten bei 4°C eluiert. Das Eluat wurde lyophilisiert und ebenfalls durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

2.2.9. FITC-Markierung von Antiseren (66,67,68)

Die zu markierende Antiserum-Probe (1o - 2o mg/ml) wurde mindestens 2 Stunden gegen o,o5 M bicarbonatgepufferte Saline pH 9,2 dialysiert (4°C). Zur Kopplung des FITC an Antikörper erfolgte eine 14 - 16 stündige Dialyse gegen eine Lösung von 1oo ug FITC/ml o,o5 M bicarbonatgepufferte Saline pH 9,2. Diese Lösung mußte vor der Dialyse 3 mal 15 Sekunden bei 1oo Watt beschallt werden. Das Volumen der FITC-Lösung sollte mindestens das 1o fache des Probenvolumens (Antiserum) betragen. Zum Stoppen der Kopplungsreaktion wurde 2 - 3 Stunden gegen o,o2 M phosphatgepufferte Saline pH 7,o dialysiert. Das so markierte Serum wurde in Aliquots von je 2o ul bei -2o°C aufbewahrt.

2.2.1o. Fluoreszenzmarkierung von Zellen (69)

4 - 5 x $1o^5$ Zellen wurden abzentrifugiert (1o Minuten bei 4oo x g) und 2 mal in MEM gewaschen. Das Sediment wurde mit 2o µl FITC markiertem Antiserum gemischt und 3o Minuten bei 4°C (Eisbad) inkubiert. Es wurde 3 mal mit je 5oo µl MEM gewaschen und die Zellen im Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

2.3. Methoden zur Darstellung und Reinigung der Mitogene

2.3.1. Bakterienkulturen

Für die Isolierung von Protein I wurde der Bakterienstamm Escherichia coli B/r verwendet. Die Zellen wurden in 2oo Liter-Ansätzen in M9 Minimalmedium (in einem Liter Wasser wurden gelöst: 6 g Na_2HPO_4, 3 g KH_2PO_4, o,5 g NaCl, 1 g NH_4Cl; folgende autoklavierte Lösungen wurden anschließend steril zugesetzt: 1o ml 4o% Glucose, 1 ml 1 M $MgSO_4$, 1 ml o,1 M $CaCl_2$) gezüchtet und in der logarithmischen Wachstumsphase (A_{578}=1,o - 1,2) geerntet. Bis zur Aufarbeitung lagerten die Bakterien bei -2o°C.

2.3.1.1. Aufschluß der Bakterien mit Glasperlen (6,7o)

2oo g tiefgefrorene Escherichia coli Bakterien wurden unter Rühren und Erwärmen schnell aufgetaut, wobei die Temperatur der Suspension unter 1o°C blieb. Die Suspension wurde mit 12 mg Desoxyribonuklease versetzt und mit 1oo ml 5o mM Natriumphosphatpuffer pH 7,8/o,1 M NaCl/5% Sucrose bei 4°C etwa 3o Minuten gerührt. In 4 - 6 Portionen wurden die Zellen etwa 4 - 7 Minuten mit 24o g Glasperlen (Durchmesser o,17 - o,18 mm) unter Eiskühlung geschüttelt (Vibrogen-Homogenisator, 5ooo - 6ooo Schwingungen pro Minute). Danach wurde im Phasenkontrastmikroskop geprüft, ob die Bakterienzellen fragmentiert waren. Die Glasperlen wurden mit einer Filternutsche von der Suspension abgetrennt. Um die Bakterienzellwände zu gewinnen, mußte das gesammelte Filtrat abzentrifugiert werden (5o Minuten bei 4o.ooo x g). Die erhaltenen Überstände wurden nochmals 5o Minuten bei 4o.ooo x g abzentrifugiert. Die Sedimente wurden wie im Abschnitt 2.3.2. beschrieben, weiterverarbeitet.

2.3.1.2. Aufschluß der Bakterien mit einer "French Press Apparatur"

2oo g tiefgefrorene Bakterien wurden unter Rühren und Erwärmen schnell aufgetaut und mit 1oo ml Puffer (1o mM Tris/HCl pH 7,5 mit o,o5% 2-Mercaptoäthanol) und 12 mg Desoxyribonuklease versetzt. Dabei wurde die Temperatur unter 1o°C gehalten. Anschließend wurde 2o Minuten bei 4°C gerührt, um eine homogene Suspension zu erhalten. Im Anschluß daran erfolgte der Aufschluß der Bakterien durch Anlegen einer Druckdifferenz in der Aminco French Press Apparatur. Bei einem Arbeitsdruck von 2o.ooo psi wurde vorsichtig das Ventil geöffnet und das heraustropfende Lysat in einem eisgekühlten Becherglas aufgefangen. Die Bakterienzellen wurden auf diese Weise 2 mal behandelt

und anschließend 5o Minuten bei 8.ooo x g abzentrifugiert (48), um den Mureinsacculus abzutrennen. Im Überstand verblieben die Bakterienmembranen, welche durch Zentrifugation (5o Minuten bei 4o.ooo x g) pelletiert und wie im Abschnitt 2.3.2. beschrieben weiter verarbeitet wurden.

2.3.2. Anreicherung von Protein I (48,49)

Protein I wurde aus dem membranhaltigen Sediment nach der Methode von Hindennach und Henning (49) extrahiert. Zum Membransediment von 2oo g Bakterien wurden 3oo ml o,o1 M Tris/HCl pH 7,5 mit 4% SDS, o,o5% 2-Mercaptoäthanol und o,5 mM $MgCl_2$ gegeben und 3o Minuten bei 3o°C gerührt. Die Suspension wurde anschließend 5o Minuten bei 4o.ooo x g zentrifugiert. Mit dem erhaltenen Sediment wurde nochmals in gleicher Weise verfahren. Beide Sedimente wurden vereinigt, in 1oo ml o,o1 M Tris/HCl pH 7,5 mit 2% SDS, o,o5% 2-Mercaptoäthanol und 5 mM EDTA resuspendiert und unter Rühren 3o Minuten bei 3o°C inkubiert. Danach wurde 6o Minuten bei 48.ooo x g zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde nochmals in gleicher Weise behandelt. Die vereinigten Überstände, die Protein II*, Protein III und Protein IV enthalten, wurden verworfen. Das Sediment wurde in 1o ml Wasser resuspendiert und mit 9o ml Aceton über Nacht bei 4°C inkubiert, um in Aceton unlösliches Protein I auszufällen. Anschließend wurde das Präzipitat noch zwei mal mit je 5o ml Aceton gewaschen, um das SDS zu entfernen und lyophilisiert. Danach erfolgte eine Trypsinbehandlung der Protein-Präparation. Da Protein I resistent gegen Trypsin-Behandlung ist, kann es so von Verunreinigungen befreit werden. Das lyophilisierte Material wurde nach der Acetonfällung in o,o2 M Tris/HCl pH 9 (5o mg/ml) resuspendiert, mit Trypsin versetzt (2oo ug/ml) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde 3o Minuten bei 27.ooo x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sendiment wurde 3 mal mit o,o2 M Tris/HCl pH9, 1 mal mit Wasser gewaschen und lyophilisiert.

2.3.3. Gelchromatographie

2.3.3.1. Aufbereitung des Säulenmaterials

Als Säulenmaterialien für die Gelfiltration wurden Ultrogele AcA 54, AcA 44, AcA 34 und AcA 22 verwendet. Es handelt sich dabei um Polyacrylamid-Agarose-Gele mit Amid- und Hydroxylgruppen, die in gequollener Form in Citratpuffer pH 6 erhältlich sind (7o). Das gequollene Säulenmaterial wurde mit 1/2 Volumenteil bidestilliertem Wasser verdünnt, entgast und danach in die Säulen gefüllt. Es wurden Econo Säulen (Durchmesser 1 cm, Länge 5o cm) mit einem Füllvolumen von 4o ml Gel verwendet. Die fertigen Säulen wurden mit einem 2,5 fachen Säulenvolumen des jeweiligen Laufpuffers äquilibriert und die Chromatographie bei 27°C durchgeführt.

2.3.3.2. Durchführung der Säulenchromatographie

Die jeweilige Proteinprobe (1 - 7 mg) wurde in 1 ml Laufpuffer (siehe Ergebnisteil) gelöst, evtl. erhitzt oder beschallt und vorsichtig auf das Säulenbett aufgetragen. Nach dem Einsickern der Probe wurde 2 mal mit je 1 ml Laufpuffer nachgespült und das Elutionsdiagramm von einem Schreiber aufgezeichnet.

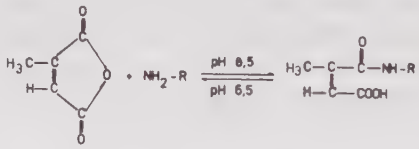
2.3.4. Spaltung von Protein I (71,72,73,74,75)

Proteine, die Methionin enthalten, können mit CNBr gespalten werden. Dabei wird der Methionin-Rest in einen C-terminalen Homoserinlacton-Rest umgewandelt (8o). Die Zahl der Spaltstücke, die man mit dieser Methode erhält, hängt von der Zahl der Methioninreste im Proteinmolekül ab.
Zur Spaltung wurden 2o mg Protein I in 2 ml 7o prozentiger Trifluoressigsäure (72) oder 7o prozentiger Ameisensäure (73) gelöst. Man gab einen mindestens 3o - 1oo fachen

Überschuß an CNBr zu und rührte bei Raumtemperatur 16 - 2o Stunden. Zur Lyophilisation wurden anschließend 2o ml bidestilliertes Wasser zugegeben und das Reaktionsgemisch bei -7o°C eingefroren. Das Lyophilisat wurde in 1o ml Wasser aufgenommen und citraconyliert (2.3.4.1.).

2.3.4.1. Citraconylierung von Proteinen (76)

Die Citraconylierung ist eine Möglichkeit, hydrophobe Proteine wasserlöslicher zu machen. Sie werden mit 2-Methylmaleinsäureanhydrid (Citraconsäureanhydrid) umgesetzt nach folgender Gleichung (R = Aminosäurerest).



1o - 1oo mg Protein wurden in Wasser bzw. Puffer suspendiert. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 8 - 8,5 eingestellt. Unter Rühren gab man 16o ul Citraconsäureanhydrid in 2o ul Portionen im Abstand von je 5 Minuten zu. Der pH-Wert mußte dabei ständig auf etwa 8 - 9 gehalten werden, da bei einem kleineren pH-Wert als 6,5 die Reaktion wieder in Richtung des Citraconsäureanhydrids verläuft. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach gab man nochmals 14o ul Citraconsäureanhydrid in 2o ul Portionen zu. Nach Ende der Reaktion wurde gegen 2o mM NH_4HCO_3 über Nacht dialysiert, um das überschüßige Citraconsäureanhydrid zu entfernen. Das citraconylierte Protein wurde lyophilisiert.

2.3.4.2. Gelfiltration der CNBr-Fragmente von Protein I

Zur Gelfiltration der CNBr-Fragmente von Protein I wurde eine Ultrogel AcA 54 Säule (Vergl. 2.3.3.) verwendet. Laufmittel war ein 5o mM Tris/HCl-Puffer pH 8,1 mit 8M Harnstoff (71).

2.3.4.3. Trypsinverdauung eines CNBr-Fragments von Protein I (72)

1 mg Protein wurde in 1 ml MEM gelöst und 5 ug Trypsinlösung (1 mg/ml) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend im Stimulationstest eingesetzt (2.4.1.).

2.4. Methoden zur Untersuchung der biologischen Wirkung der Mitogene auf Leukozyten

Zur Untersuchung der biologischen Wirkung von Protein I und seiner Spaltstücke wurden Stimulationsexperimente und hämolytische Plaque-Tests durchgeführt.

2.4.1. Stimulationsexperimente in vitro

In allen Experimenten wurden Milzlymphozyten aus 6 - 1o Wochen alten Mäusen zur Stimulation eingesetzt. Es wurden Balb/c (Fa. Ivanovas, Kißlegg oder eigene Zucht), C3H/HeJ (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) und C3H/Tif/Bom-nu nu (Bomholtgard, Ry, Denmark) Mäuse verwendet.

2.4.1.1. Präparation der Lymphozyten

Der durch Dislokation des Halswirbels getöteten Maus wurde die Milz steril entnommen und in einem Glas-Homogenisator vorsichtig in 1o ml MEM homogenisiert. Die Zellen wurden durch ein steriles Wattefilter von Geweberesten befreit und zwei mal in MEM gewaschen (Zentrifugation je 1o Minuten bei 4oo x g und 4°C). Danach wurden die Zellen in 2o ml Kulturmedium (RPMI 164o, 1% Refobacin, 1% Fungizon, 3,3% FCS, 1,54% 2o mM L-Glutamin-Lösung, o,77% Penicillin-Streptomycinlösung und o,o3% 1,4 M 2-Mercaptoäthanol) resuspendiert und auf einen Zelltiter von 3,3 x $1o^6$ Zellen/ml eingestellt.

2.4.1.2. Präparation der Thymozyten

Einer durch Genickbruch getöteten Maus wurde der Thymus steril entnommen und aufgearbeitet wie im Abschnitt 2.4.1.1. beschrieben. Nach dem Waschen der Thymozyten wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und auf einen Zelltiter von 1 x $1o^7$/ml eingestellt.

2.4.1.3. Vorbereitung der Mitogene

Die verwendeten Mitogene wurden in einer Konzentration von o,5 mg - 3 mg/ml in MEM durch Beschallung mit einem Ultraschallstab (15 Sekunden, 4oo Watt) unter Eiskühlung dispergiert und sofern nicht anders erwähnt in einer 1 : 2 Verdünnungsreihe im Stimulationstest eingesetzt. Jede einzelne Verdünnungsstufe wurde unmittelbar vor Testansatz nochmals kurz beschallt.

2.4.1.4. Lymphozytenstimulationstest

Jeweils 133 ul Zellsuspension wurden zusammen mit 5o ul Mitogenverdünnung im CO_2 begasten Brutschrank (6,4%) bei 37^oC inkubiert. Nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden wurden o,5 uCi entsprechend 2o ul einer ^3H-Thymidinlösung zupipettiert. Die ^3H-Thymidinlösung setzt sich aus o,5 ml Thymidin (12 mg/1o ml MEM), einem ml ^3H-Thymidin (25 Ci pro mMol) und 38,5 ml MEM zusammen. Die Markierungsdauer betrug 24 Stunden, danach wurden die Zellen gezählt und bei $-2o^oC$ bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Nach dem Auftauen der Zellkulturen wurden sie mit einem Mash II Erntegerät auf Glasfiberfilterstreifen aufgesaugt. Die getrockneten Filterplättchen (mindestens 3o Minuten bei $1oo^oC$) wurden in Szintillationsgläschen überführt und die Aktivität der Proben mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit im Beta-Szintillationszähler gemessen.

2.4.1.5. Abtrennung von adhärenten Zellen

Zur Abtrennung von adhärenten Zellen aus Milzlymphozytenkulturen wurde nach folgenden Methoden verfahren.

2.4.1.5.1. Abtrennung von Makrophagen durch Adhärenz an Plastik-Petri-Schalen (59)

Milzlymphozyten wurden gewonnen wie im Abschnitt 2.4.1.1. beschrieben. Die Zellzahl wurde auf 5 - 1o x $1o^7$ Zellen pro ml eingestellt mit Kulturmedium, dem 2o% FCS (Endkonzentration) zugesetzt wurde. Jeweils 15 ml dieser Zellsuspension wurden 45 Minuten bei 37°C in einer Plastik-Petri-Schale (Durchmesser 9 cm) inkubiert und danach die nicht adhärenten Zellen abpipettiert. Dieser Vorgang wurde bei einigen Experimenten noch 2 mal wiederholt. Danach wurden die nicht adhärenten Zellen 2 mal in MEM gewaschen, wieder in frischem Kulturmedium (mit 3,3% FCS) resuspendiert und im Stimulationstest eingesetzt.

2.4.1.5.2. Abtrennung von adhärenten Zellen durch Chromatographie über Sephadex G 1o-Säulen (6o)

Sephadex G 1o wurde mit 3 - 4 Volumenteilen Saline versetzt und inkubiert, bis das Säulenmaterial gequollen war (24 Stunden bei 4°C). Danach wurde es in Glasgefäßen 2 Stunden bei 11o°C sterilisiert. Nach dem Gießen der Säule (1 x 2o cm) wurde sie mit dem 2,5 fachen Säulenvolumen MEM, das 1o% FCS enthielt, äquilibriert. Zum Abtrennen von adhärenten Milzlymphozyten wurden 1 - 2 x $1o^8$ Zellen in 1 ml MEM/1o% FCS resuspendiert und bei 25°C auf die G 1o-Säule aufgetragen. Es wurde mit MEM/1o% FCS nachgespült. Sobald die Zellen am unteren Rand der Säule angelangt waren, wurden sie in einem Plastikröhrchen gesammelt (etwa 1o bis 2o ml), anschließend 1 - 2 mal in MEM gewaschen und zum Stimulationstest oder zur Zelltrennung weiter verwendet.

2.4.1.6. Trennung von B- und T-Lymphozyten

B- und T-Lymphozyten aus der Milz wurden mit Hilfe von Anti-Theta- bzw. Anti-Immunoglobulin-Seren und Komplement, sowie durch Verwendung von Sojabohnenagglutinin oder mit Hilfe einer Nylonwolle-Säule aufgetrennt.

2.4.1.6.1. Trennung von B- und T-Lymphozyten mit Anti-Theta- , Anti-Immunoglobulin-Seren und Komplement

Zur Gewinnung der Milzzellen siehe Abschnitt 2.4.1.1.. Die Zelltrennungen wurden entweder mit einer gesamten Milzlymphozytenpopulation oder mit einer an adhärenten Zellen verarmten Milzzellpopulation (2.4.1.5.1.) durchgeführt.
1×10^7 Milzzellen wurden in 1 ml Anti-Theta-Serum (1 : 10 verdünnt in MEM) resuspendiert und 30 Minuten bei $4^{\circ}C$ inkubiert. Ebenso wurden 1×10^7 Milzlymphozyten in 1 ml Kaninchen-Anti-Maus-Immunoglobulin-Serum (1 : 20 verdünnt in MEM) resuspendiert und 30 Minuten bei $4^{\circ}C$ inkubiert. Danach wurden die Zellen 1 mal in MEM gewaschen und in je 1 ml 1 : 6 verdünntem Meerschweinchen-Komplement aufgenommen. Es wurde 40 Minuten bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Im Anschluß daran wurde 2 mal mit MEM gewaschen und die übrigen Zellen mit Kulturmedium auf einen Titer von $3{,}3 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Sie wurden im Stimulationstest untersucht.

2.4.1.6.2. Trennung von B- und T-Lymphozyten mit Sojabohnenagglutinin (61)

Die Gewinnung der Milzlymphozyten aus Balb/c Mäusen erfolgte wie im Abschnitt 2.4.1.1. beschrieben. Nach dem Waschen mit MEM wurden 2×10^8 Zellen in 0,5 ml MEM resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 0,5 ml SBA (2 mg pro ml MEM) gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann wurden die Zellen mit einer Pasteur-

Pipette vorsichtig auf 4o ml 5o prozentiges FCS (FCS/MEM) in einem Zentrifugenglas aufgetragen. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur sind die meisten agglutinierten Zellen sedimentiert (B-Lymphozyten) während die nicht agglutinierten Zellen an der Oberfläche der Flüssigkeit verblieben. Die oberen und unteren Fraktionen wurden mit Pasteur-Pipetten in Plastik-Zentrifugenröhrchen überführt und 1o Minuten bei 4oo x g und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden danach zur Ablösung des Lektins in 1o ml o,2 M D-Galaktose in MEM resuspendiert und 1o Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 2 mal mit je 1o ml D-Galaktose in MEM gewaschen und 2 mal mit je 1o ml MEM. Die Zellen konnten dann im Stimulationstest eingesetzt werden.

Bei einigen Experimenten wurden aus der Milzzellsuspension vor der Trennung in B-Lymphozyten und T-Lymphozyten die Erythrozyten entfernt, indem man die Milzzellsuspension (1 - 5 x $1o^7$ Zellen /ml) über Lympholyte abzentrifugierte. Die Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen an Lympholyte versetzt und 2o Minuten bei 2.5oo rpm zentrifugiert. Dabei sammelten sich die Lymphozyten an der Phasengrenze von Lympholyte und Medium, während die Erythrozyten sedimentierten. Die so gereinigten Lymphozyten wurden 1 - 2 mal in MEM gewaschen.

2.4.1.6.3. Trennung von B- und T-Lymphozyten mit Hilfe einer Nylon-Wolle-Säule (62,77)

Eine 1o ml Spritze wurde mit o,6 g gewaschener und getrocknter Nylon-Wolle (62) gepackt und mit etwa 5o ml MEM (vorgewärmt auf 37°C) gewaschen. Anschließend wurde der Auslauf der Spritze mit einem Schlauch und einer Klemme verschlossen, die Spritze mit MEM gefüllt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluß daran ließ man die Säule trocken laufen, und nach dem Verschließen wurde

sie mit o,7 - 1 x $1o^8$ Zellen (5 x $1o^7$ Zellen/ml MEM mit 5% FCS) beladen und mit MEM/5% FCS aufgefüllt. Es wurde 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die T-Lymphozyten mit 2o ml vorgewärmtem MEM/5% FCS eluiert (1 Tropfen pro Sekunde) und 1o Minuten bei 4oo x g abzentrifugiert. B-Lymphozyten und Makrophagen wurden mit 2o ml eiskalter Saline eluiert und die Nylonwolle dabei gut ausgepreßt. Beide Zellpopulationen wurden im Stimulationstest untersucht.

2.4.2. Untersuchung der Antikörperproduktion von B-Lymphozyten nach Stimulation mit Mitogenen

Milzlymphozyten wurden gewonnen wie im Abschnitt 2.4.1.1. beschrieben und auf einen Zelltiter von 5,5 x $1o^6$ Zellen pro ml eingestellt, wobei dem Kulturmedium 1o% FCS zugesetzt waren. Je 9oo ul dieser Zellsuspension wurden zusammen mit 1oo ul Mitogenlösung in MEM (Vergl. 2.4.1.3.) in sterilen 1o ml Plastikröhrchen 3 bzw. 4 Tage im CO_2-begasten Brutschrank (5% CO_2) inkubiert. Danach wurden die Zellen 1 mal in MEM gewaschen und mit Glucose-Medium (MEM + o,45% Glucose) auf einen Zelltiter von 1 x $1o^7$/ml bzw. 5,5 x $1o^5$/ml eingestellt. Es wurden jeweils 1oo µl dieser Zellsuspensionen im hämolytischen Plaque-Test eingesetzt.

2.4.2.1. Hämolytischer Plaque-Test mit TNP-beschichteten Erythrozyten (78,79)

1 ml gepackte Schafserythrozyten (Zentrifugation 5 Minuten bei 3.ooo rpm) wurden nach dreimaligem Waschen mit Saline mit 2o mg TNP, gelöst in 7 ml Cacodylatpuffer (4,58 g Cacodylsäure auf 1oo ml H_2O, pH 6,9), 1o Minuten an einem dunklen Ort bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten so lange gewaschen,bis keine Hämolyse mehr auftrat und konnten über Nacht in 1 ml Glucose-Medium bei 4°C aufbewahrt werden. Vor dem unmittelbaren Gebrauch wurden die Erythrozyten noch 2 mal

mit Saline gewaschen und in 2 ml Glucose-Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden je 2o ul im Plaque-Test eingesetzt.
Meerschweinchen-Komplement wurde nach Vorschrift gelöst (Fa. Paesel, Produktinformation). Je 1 ml Lösung wurde an 1 ml gepackte Erythrozyten 1 Stunde bei 4°C absorbiert. Nach der Absorption wurden die Erythrozyten 1o Minuten bei 2.5oo rpm zentrifugiert und der Überstand (Komplement) vorsichtig abpipettiert. Das Komplement wurde 1 : 2,5 verdünnt in Glucose-Medium und bei -7o°C eingefroren, bis es im Test eingesetzt werden konnte.
Der TNP-Plaque-Test wurde wie folgt durchgeführt: 1oo ul Zellsuspension (1 x $1o^7$ Zellen/ml) wurden zusammen mit 2o ul mit TNP beschichteten Erythrozyten und 2o ul Meerschweinchen-Komplement in ein dünnes 5 ml Plastikröhrchen pipettiert. Nun wurden 3oo ul 56°C warmes Agarose-Medium (MEM/o,45% Glucose/0,5% Agarose) rasch zugegeben und nach gutem Mischen auf dem Wirlmix sofort auf eine Petrischale (Durchmesser 9 cm) ausplattiert. Die Petrischalen wurden zunächst 3o Minuten bei Raumtemperatur belassen und danach 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Petrischalen gegen eine Lampe gehalten und die hämolytischen Plaques ausgezählt.

2.4.2.2. Hämolytischer Plaque-Test mit Protein A-beschichteten Erythrozyten (82)

Die Schafserythrozyten wurden gewaschen wie im Abschnitt 2.4.2.1. beschrieben. 2oo ul gepackte Erythrozyten wurden mit 1oo ul Saline, 1oo ul Protein A-Lösung (1 mg/ml) und 2 ml einer 1 : 2oo verdünnten 2,5 x $1o^{-4}$ molaren $CrCl_3$-Lösung (mindestens 3 Monate gealtert) pH 4,5 versetzt, gut gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dabei müssen die Erythrozyten alle 15 Minuten geschüttelt werden. Anschließend wurden die Erythrozyten 2 mal mit Saline gewaschen und in 1 ml Glucose-Medium über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Danach wurden sie noch 2 mal in Saline ge-

waschen und in 6oo µl Glucose-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde im Plaque-Test eingesetzt. Das Komplement für den Protein A-Plaque-Test wurde vorbereitet wie im Abschnitt 2.4.2.1. beschrieben. Als Antiserum wurde ein Kaninchen-Anti-Maus-Immunoglobulinserum (wurde von Dr. R.B. Johnson zur Verfügung gestellt) verwendet. Der Protein A-Plaque-Test wurde wie folgt durchgeführt: Zu 1oo ul Zellsuspension (5,5 x $1o^5$ Zellen/ml) gab man 2o µl Protein A-beschichtete Erythrozyten, 2o µl Antiserum und 2o ul Komplement. Nach Zugabe von 3oo µl Agarose-Medium wurde ausplattiert, wie im Abschnitt 2.4.2.1. beschrieben. Die Tests konnten erst nach einer 6 stündigen Inkubation bei 37^oC ausgewertet werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Darstellung und Reinigung von Protein I

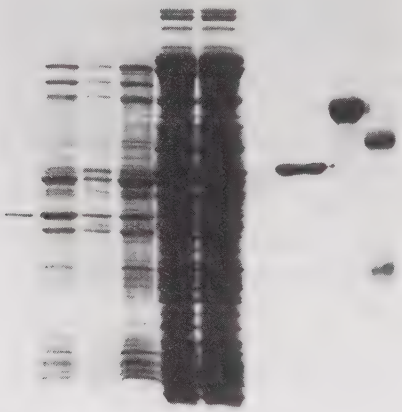
Protein I wurde nach den Methoden von Rosenbusch (6), Hindennach und Henning (49) und Caldwell et al. (48) aus dem Bakterienstamm Escherichia coli B/r isoliert (Vergl. 2.3.). Die Ausbeute lag im Bereich zwischen 5o mg und 8oo mg pro 1oo g Bakterien-Feuchtgewicht, wobei der Grad der Verunreinigungen wie SDS, LPS, Lipide, Proteine sehr unterschiedlich war. Das erhaltene Protein I wurde durch Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert (Abb. 1) wie im Abschnitt 2.2.3. beschrieben.
Mit Hilfe von verschiedenen Polyacrylamidgelen konnte für Protein I eine Molekulargewichtsbestimmung durchgeführt werden (Vergl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Molekulargewichtsbestimmung für Protein I

Gel Nr.	Acrylamidkonzentration in %	Molekulargewicht
1	15	36.ooo
2	7,5-15	35.ooo
3	7,5-15	35.ooo
4	7,5-15	36.ooo
5	2o	37.ooo

Das aus 5 verschiedenen Bestimmungen ermittelte Molekulargewicht beträgt 35.8oo, der theoretische Wert liegt bei 37.2o5 (7).
Die Charakterisierung der Protein I-Präparationen konnte durch eine empfindlichere Färbemethode für Polyacrylamidgele mit Silbernitrat (5o,51), durch Nachweis von SDS (52) und Proteinbestimmung nach Bradford (53) durchgeführt werden.

Beispielsweise hatte eine Protein I-Präparation folgende Zusammensetzung: Proteingehalt 35,6%; SDS-Gehalt 14,5%; Lipidgehalt 11,4% und andere Verunreinigungen 38,5%. Um die Verunreinigungen abzutrennen, wurde Protein I durch Gelfiltration weiter angereichert.



A B C D E F G H J

Abbildung 1: Elektropherogramm zur Präparation von Protein I

Zur Charakterisierung der Protein-Präparate wurde ein lineares Polyacrylamidgradientengel von 7,5-15 % hergestellt. Die Laufzeit betrug 3,5 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 2o mA. Zur Gelfärbung wurde Coomassie Blue verwendet. In die einzelnen Geltaschen wurden folgende Proben aufgetragen:

A Endprodukt nach Acetonfällung und Trypsinverdauung (2.3.2)
B Membransediment nach Extraktion mit 4% SDS und o,5 mM $MgCl_2$ (2.3.2.)
C Membransediment
D Überstand nach Extraktion des Membransediments mit 4% SDS
E+F Nach Abtrennung des Plasmas verbleibender Überstand
G Fumarase als Eichprotein (MW 48.ooo)
H BSA als Eichprotein (MW 68.ooo)
I Gammaglobulin als Eichprotein (MW 5o.ooo und 25.ooo)

3.1.1. Gelfiltration von Protein I

Zur weiteren Reindarstellung des Protein I wurde Gelchromatographie mit Ultrogel-Säulen AcA 54, AcA 44, AcA 34 und AcA 22 unter jeweils gleichen Bedingungen (2.3.3.) unter Verwendung von Puffer A als Laufmittel (5 mM EDTA, 1o mM Tris/HCl pH 7,5, 1% SDS) durchgeführt. Abbildung 2 zeigt die dazugehörigen Elutionsdiagramme. Die Ultrogel-Säule AcA 44 schließt Proteine mit einem Molekulargewicht von 2oo.ooo aus, bei Ultrogel AcA 34 liegt der Ausschluß bei einem Molekulargewicht von 75o.ooo und bei Ultrogel AcA 22 liegt er bei einem Molekulargewicht von 3.ooo.ooo.

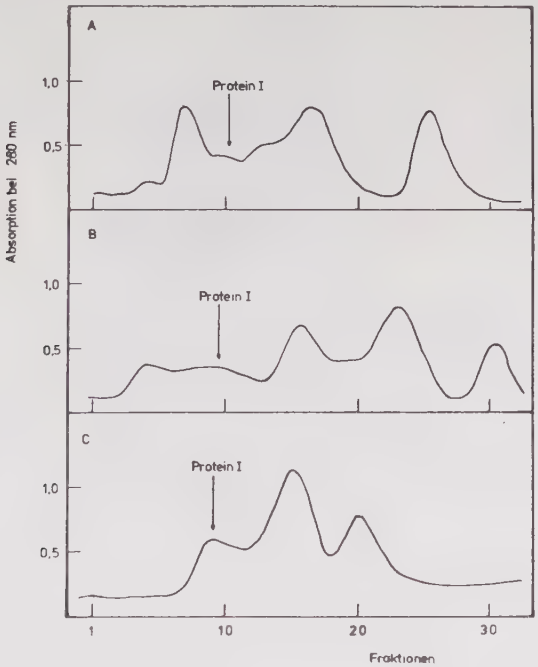


Abbildung 2: Elutionsdiagramme der Gelfiltration von Protein I

Das Säulenvolumen betrug jeweils 4o ml; als Laufmittel wurde Puffer A verwendet. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 3 ml pro Stunde. Es wuroe je 1 ml Proteinprobe (1-7 mg) chromatographiert und vor dem Auftragen auf die Säule 5 Min. bei 1oo°C inkubiert. A: Ultrogel AcA 44, B: Ultrogel AcA 34 C: Ultrogel AcA 22

Weiterhin wurde der Einfluß der SDS-Konzentration und der Salzkonzentration auf die Trennung der einzelnen Komponenten untersucht und in Abb. 3 dargestellt. Bei diesem Experiment wurde eine Ultrogel AcA 54 Säule verwendet (der Ausschluß liegt bei einem Molekulargewicht von 9o.ooo).

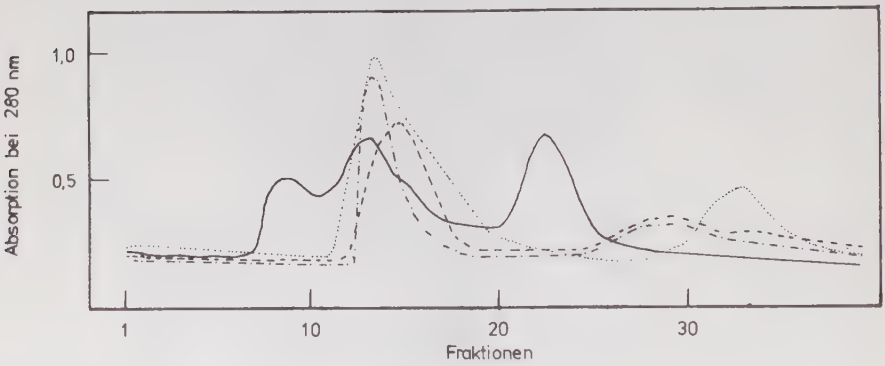


Abbildung 3: Gelchromatographie über Ultrogel AcA 54 von Protein I-Präparaten

Das Säulenvolumen betrug 4o ml und die Tropfgeschwindigkeit 2,8 ml pro Stunde. Es wurden je 5oo ul einer citraconylierten Protein I-Lösung (1 mg/ml) chromatographiert und vor dem Auftragen auf die Säule 5 Minuten bei 1oo°C inkubiert. Die Citraconylierung des Proteins erfolgte zur Verbesserung seiner Löslichkeit.

(————) Als Laufmittel wurde Puffer A verwendet (1% SDS).

(.....) Als Laufmittel wurde Puffer A mit 5oo mM NaCl verwendet.

(-.-.-.-.-) Laufmittel war Puffer A ohne SDS und ohne NaCl.

(- - - - - - -) Laufmittel war Puffer A mit nur o,2% SDS.

3.1.2. Immunpräzipitation von Protein I

Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung von Protein I aus Proteingemischen ist die Immunpräzipitation (2.2.8.). Hierbei wurde ein Kaninchen-Anti-Protein I-Serum verwendet (2.2.4.1. und 2.2.4.3.) mit einem Titer von 64 (Vergl. 2.2.7.). Die spezifische Aktivität des Serums wurde außerdem im radialen Immundiffusionstest nach Mancini überprüft (2.2.6.). Das Ergebnis der Immunpräzipitation zeigt Abbildung 4. Protein I wurde mit Hilfe des Kaninchen-Anti-Protein I-Serums aus einer Lösung, die mehrere Verunreinigungen enthielt, präzipitiert, der Antigen-Antikörperkomplex an Protein A-Sepharose zunächst gebunden und später eluiert. Als Kontrolle wurde Serum an Protein A-Sepharose gebunden und ebenfalls eluiert. Eluate und Überstände wurden durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (2.2.8.).

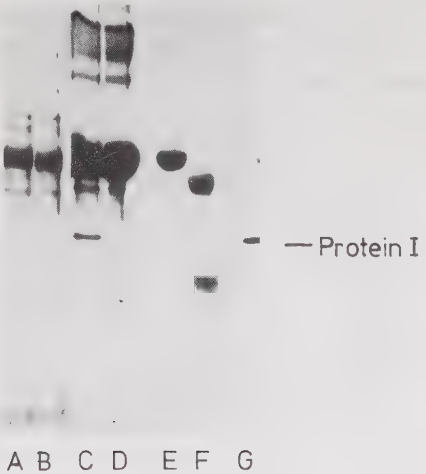


Abbildung 4: Elektropherogramm zur Immunpräzipitation von Protein I

Zur Analyse wurde ein mit Coomassie Brillant Blue gefärbtes Gradientengel (7,5-15%) gewählt.
A Anti-Protein I Serum mit 1o% TCA gefällt
B Überstand der Immunpräzipitation mit TCA gefällt
C Eluierter Antigen-Antikörperkomplex
E BSA als Eichprotein (MW 68.ooo)
F Gammaglobulin als Eichprotein (MW 5o.ooo und 25.ooo)
G Gereinigtes Protein I

3.2. CNBr-Spaltung von Protein I und Trennung der Spaltstücke

Da Protein I nur 4 Methioninreste enthält, lag es nahe, durch Spaltung mit CNBr Fragmente zu gewinnen und diese genauer auf ihre biologischen Eigenschaften zu untersuchen. Protein I wurde mit CNBr gespalten (Vergl. 2.3.4.) und anschließend lyophilisiert. Die Mischung der entstandenen Spaltstücke wurde mit 2-Methylmaleinsäureanhydrid citraconyliert und nach etwa 24stündiger Dialyse gegen 2 Liter 2o mM NH_4HCO_3-Lösung nochmals lyophilisiert (Vergl. 2.3.4.). 5 mg der Spaltstücke wurden in 1 ml Laufmittel gelöst (Vergl. 2.3.3.) und über Ultrogel AcA 54 chromatographiert. Das Elutionsdiagramm zeigt Abb. 5. Im ersten Peak (A) befindet sich das größte Spaltstück mit einem Molekulargewicht von etwa 24.ooo (= CNBr 1), wie Abb. 6 zeigt. In den später eluierenden Peaks (B + C) befinden sich die kleineren CNBr-Fragmente.

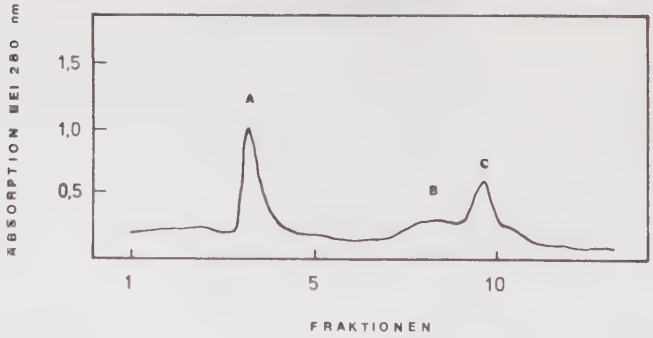
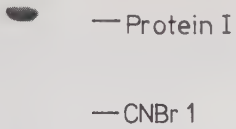


Abbildung 5: Elutionsdiagramm der CNBr-Spaltstücke von Protein I über Ultrogel AcA 54

Es wurden 5 mg Protein aufgetragen und als Laufmittel Tris/HCl-Puffer pH 8,1 mit 8 M Harnstoff gewählt. Das Fraktionsvolumen betrug 3,8 ml pro Stunde.

Die gepoolten Fraktionen des Peaks A wurden nach einer 48stündigen Dialyse lyophilisiert und durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Abb. 6).



A B

Abbildung 6: Polyacrylamidgelelektrophorese von Protein I und dem CNBr-Fragment CNBr 1
In die Geltaschen wurden folgende Proben aufgetragen:
A CNBr-Fragment CNBr 1
B Protein I
Die Laufzeit des 2o%igen Polyacrylamidgels betrug 4 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 2o mA. Gefärbt wurde mit Coomassie Brillant Blue.

Zur genaueren Bestimmung des Molekulargewichts des CNBr-Spaltstücks von Protein I wurden verschiedene Gele verwendet, wie aus Tabelle 2 hervorgeht. Dabei konnte ein durchschnittliches Molekulargewicht von 21.4oo bestimmt werden.
Die kleineren CNBr-Spaltstücke von Protein I konnten ebenfalls durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert werden. Abbildung 7 zeigt ein Elektropherogramm von ungetrennten CNBr-Fragmenten von Protein I.

Tabelle 2: Molekulargewichtsbestimmung vom CNBr-Fragment CNBr 1

Gel Nr.	Acrylamidkonzentration in %	Molekulargewicht
1	15	2o.ooo
2	7,5-15	21.5oo
3	7,5-15	22.ooo
4	1o-2o	21.5oo
5	2o	22.ooo

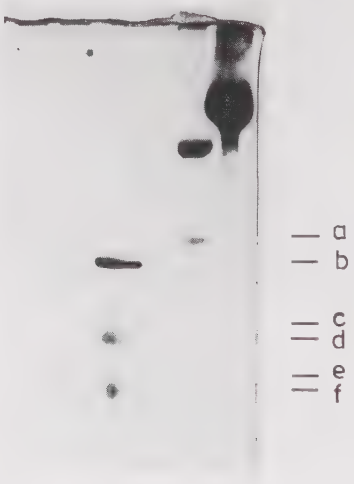


Abbildung 7: Elektropherogramm von CNBr-Fragmenten von Protein I

A: CNBr-Fragmente von Protein I
B: Gammaglobulin als Eichprotein (MW 5o.ooo und 25.ooo)
C: Human-Transferin als Eichprotein (MW 81.ooo)
Die Proteinbanden wurden mit Silbernitrat angefärbt, und es konnten folgende Molekulargewichte ermittelt werden: a 26.ooo, b 21.5oo, c 13.ooo, d 11.ooo, e 8.5oo und f kleiner als 8.5oo.

3.3. Ergebnisse zur Untersuchung der biologischen Wirkung der Mitogene auf Leukozyten

Um die biologische Wirkung von Protein I und Protein I-Fragmenten zu untersuchen, wurden vor allem Stimulationsexperimente mit Milzzellen verschiedener Mäuse-Stämme durchgeführt. Weiterhin wurde die Wirkung der beschriebenen Proteine auf getrennte Milz-Zell-Populationen und auf Thymozyten getestet.

3.3.1. Untersuchung der Stimulation von Milzzellen unter Einwirkung von Protein I und Fragmenten von Protein I

In den folgenden Stimulationsexperimenten wurden Milzzellen und Mitogene vorbereitet, wie in den Abschnitten 2.4.1.1. und 2.4.1.3. beschrieben. Aus einer 6 - 8 Wochen alten Maus konnten 8×10^7 bis $1{,}5 \times 10^8$ Milzzellen gewonnen werden. In diesen Experimenten wurde der Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA sich teilender Milzlymphozyten als Maß für die mitogene Aktivität der untersuchten Proteine herangezogen. Als Vergleichsexperiment wurde in allen Fällen die Stimulation von Lymphozyten unter Einwirkung von Concanavalin A durchgeführt. Die angegebenen Werte sind, wenn nicht anders vermerkt, Mittelwerte aus 2-4 Parallelansätzen mit Standardabweichungen.

3.3.1.1. Zeit-Abhängigkeit der Stimulation von Milzlymphozyten mit Protein I und CNBr 1

Um die optimale Inkubationszeit für die beiden zu testenden Substanzen Protein I und CNBr 1 zu ermitteln, wurde die Stimulation nach 24, 48, 72 und 96 Stunden untersucht. In allen Experimenten wurden die Zellkulturen in den letzten 24 Stunden mit ^{3}H-Thymidin markiert. Die Ergebnisse gehen aus Abb. 8 hervor. Den besten Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von Milzzellen erhält man, wenn die Zellen nach 48 Stunden Gesamtinkubationszeit in

Gegenwart von den zu testenden Substanzen geerntet werden. Daher wurde bei den meisten Stimulationsexperimenten eine Inkubationszeit von 48 Stunden gewählt.

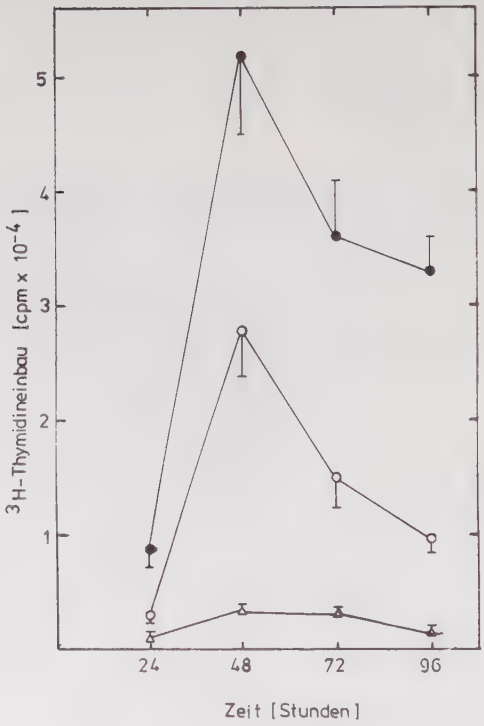


Abbildung 8: Zeit-Abhängigkeit der Stimulation von Milzlymphozyten mit Protein I und CNBr 1
Es wurden Milzlymphozyten einer Balb/c Maus verwendet, wobei die Proteinkonzentration 273 ug/ml betrug. Für die getesteten Substanzen wurden folgende Symbole gewählt:
(●——●) für Protein I, (○——○) für CNBr 1 und
(▲——▲) für Kontrollen ohne Mitogen.

3.3.1.2. Dosis-Abhängigkeit von verschiedenen Protein I-Präparaten und dem CNBr-1 Fragment bei der Stimulation von Milzzellen aus C3H/HeJ-Mäusen

In den folgenden Stimulationsexperimenten wurden C3H/HeJ-Mäuse verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Mäuse-Inzucht-Stamm, dessen Milzzellen aufgrund eines genetischen Defektes (83,84) nicht durch LPS mitogen stimulierbar sind. Milzlymphozyten wurden zusammen mit den entsprechenden Mitogenen 48 Stunden bei 37°C in 5% CO_2-Atmosphäre vorinkubiert (Vergl. 2.4.1.4.) und danach 24 Stunden mit o,5 uCi ^{3}H-Thymidin markiert. Als Mitogene wurden die folgenden Protein-I Präparate verwendet(siehe Tabelle 3); Protein IA wurde nach der Methode von I. Hindennach und U. Henning (49) präpariert und vor der beschriebenen Gelchromatographie im Stimulationstest eingesetzt; dasselbe Protein wurde auch nach einer Reinigung über Ultrogel AcA 54 (Vergl. 2.3.3.2.) getestet; Protein IB und Protein IC wurden nach einer etwas abgewandelten Methode nach Caldwell et al. (48) präpariert. Die Dosis-Abhängigkeit der Stimulation für die genannten Mitogene wird in Tabelle 3 dargestellt. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, erzielt man bei höheren Konzentrationen der Protein I-Präparate und des CNBr-1-Fragments eine bessere Stimulation, während bei Verwendung von Con A als Mitogen das Optimum bei niederen Mitogenkonzentrationen (1-2 ug) liegt.

3.3.1.3. Dosis-Abhängigkeit von Protein I und seiner Fragmente bei der Stimulation von Milzzellen aus Balb/c Mäusen

Bei diesen Stimulationsexperimenten wurden Milz-Lymphozyten aus Balb/c Mäusen verwendet. Im Gegensatz zu den C3H/HeJ-Mäusen sind Milzzellen aus Balb/c Mäusen mit LPS mitogen stimulierbar. Milzlymphozyten wurden mit den entsprechenden Mitogenen 24 Stunden bei 37°C vorinkubiert und danach weitere 24 Stunden mit ^{3}H-Thymidin

Tabelle 3: Stimulation von Milzlymphozyten aus C3H/HeJ-Mäusen mit verschiedenen Protein I-Präparaten, dem CNBr 1-Fragment und Con A

Mitogenkonz. (ug/ml)	Protein IA	Protein IA n. Chromatogr. ü. Ultrogel AcA 54	Protein IB	Protein IC	CNBr 1	Con A
273	6684±275	N.D.	3828±58o	4o22±672	5853±941	N.D.
137	7584±12o9	1755±399	5o7o±665	4897±346	498o±752	64±24
68	1o363±582	2o45±852	5773±159o	4335±1o71	4264±635	98±8
34	7492±1867	5388±83o	4791±1265	3442±28o	449o±437	454±242
17	253o±5o9	4968±1o54	273o±672	248o±774	2812±472	2o17±1291
8,5	3714±887	3748±111o	2742±234	2835±774	215o±292	5813±2412
4,3	919±158	3752±571	484o±1573	3584±7o1	1688±3o7	15929±2753
2,1	22o1±365	1752±8oo	5376±1o24	334o±313	1455±217	31916±1327
1,1	1664±47o	N.D.	4466±1317	3o81±879	1374±336	17o98±421
0	1o65±14o	4o9±118	1637±778	1856±534	828±83	995±125

N.D.: Nicht durchgeführt

markiert. Als Mitogene wurden Protein IA (Vergl. 3.3.1.1.), das CNBr 1-Fragment und eine Mischung der niedermolekularen CNBr-Fragmente von Protein I verwendet. Abbildung 9 zeigt die Dosis-Wirkungskurven für die drei Substanzen. Daraus wird ersichtlich, daß die stimulierende Wirkung auf Balb/c Milzzellen von Protein I und CNBr 1 in etwa vergleichbar ist, während eine Mischung der niedermolekularen CNBr-Fragmente von Protein I keine Wirkung zeigt.

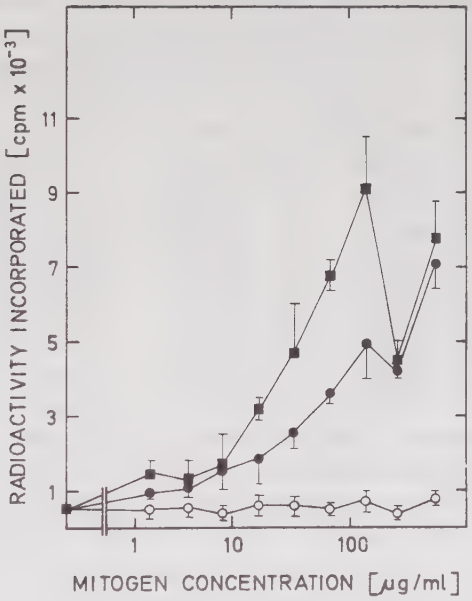


Abbildung 9: Dosis-Wirkungskurven für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von Balb/c Milzlymphozyten nach Einwirkung von Protein I (■——■), CNBr 1 (●——●) und einer Mischung von niedermolekularen CNBr-Fragmenten von Protein I (○——○). Die Zellen wurden 24 Stunden vorstimuliert und weitere 24 Stunden mit ^{3}H-Thymidin markiert.

Um Informationen über die RNA-Synthese und Proteinbiosynthese während der Stimulation mit den beschriebenen Substanzen zu erhalten, wurde der Einbau von ^{3}H-Uridin in die mRNA und von ^{3}H-Leucin in Proteine nach 24stündiger Stimulation untersucht. Dabei wurde jeweils 4 Stunden oder 24 Stunden markiert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4 und 5 dargestellt.

Tabelle 4: ^{3}H-Uridineinbau in Balb/c Milzlymphozyten

Mitogenkonz. (ug/ml)	Protein I[1)]	Protein I[2)]	CNBr 1[2)]
273	1791±351	136±7	123±4
137	891±316	97±1	95±15
68	1178±251	91±9	82±4
34	6o3±1o7	132±31	76±24
17	588±121	139±27	78±1o
8,5	415±38	112±13	84±15
4,3	767±128	131±4	68±6
2,1	494±143	117±4	52±6
1,1	333±57	1o8±4	38±31
0	263±125	89±32	62±24

1) 24 Stunden Markierungsdauer

2) 4 Stunden Markierungsdauer

Bei einer Markierungsdauer von 24 Stunden konnte mit steigender Mitogenkonzentration ein ebenfalls steigender Einbau an ^{3}H-Uridin (Tabelle 4) in die mRNA der Lymphozyten gemessen werden. Die Stimulation ist jedoch vergleichsweise gering. Bei einer Markierungsdauer von 4 Stunden konnte nur ein geringer Einbau festgestellt werden. Die Proteinbiosyntheserate konnte ebenfalls bestimmt werden (^{3}H-Leucineinbau, Tabelle 5), jedoch ergab hier eine Markierungsdauer von 4 Stunden einen höheren ^{3}H-Leucineinbau bei steigender Mitogenkonzentration als eine Markierungsdauer von 24 Stunden.

Tabelle 5: ^{3}H-Leucineinbau in Balb/c Milzlymphozyten

Mitogenkonz. (ug/ml)	Protein I[1)]	Protein I[2)]	CNBr 1[2)]
273	717±92	1oo9±23	7o8±163
137	886±126	746±234	693±156
68	74o±1o1	948±59	6o8±83
34	685±75	861±142	7o3±113
17	715±79	653±47	611±1o3
8,5	683±94	592±141	634±117
4,3	7o2±191	568±61	528±147
2.1	544±29	19o±53	444±39
1,1	483±6o	452±68	554±55
0	127±23	3o6±113	4o1±23

1) 24 Stunden Markierungsdauer
2) 4 Stunden Markierungsdauer

Es sollte zusätzlich untersucht werden, ob selbst kleinere Spaltstücke des CNBr 1-Moleküls mitogene Aktivität auf Balb/c Milzlymphozyten haben. Das CNBr 1-Fragment von Protein I wurde mit Trypsin gespalten (Vergl. 2.3.4.3.). Die erhaltenen Trypsinfragmente wurden über eine Amicon PM 1o-Membran durch Ultrafiltration vom nicht gespaltenen Protein getrennt und im Stimulationstest eingesetzt. Abbildung 1o zeigt Dosis-Wirkungskurven für CNBr 1 und eine Mischung der Trypsin-Spaltstücke. Daraus wird ersichtlich, daß Trypsin-Fragmente von CNBr 1 ihre mitogene Aktivität weitgehend verlieren.

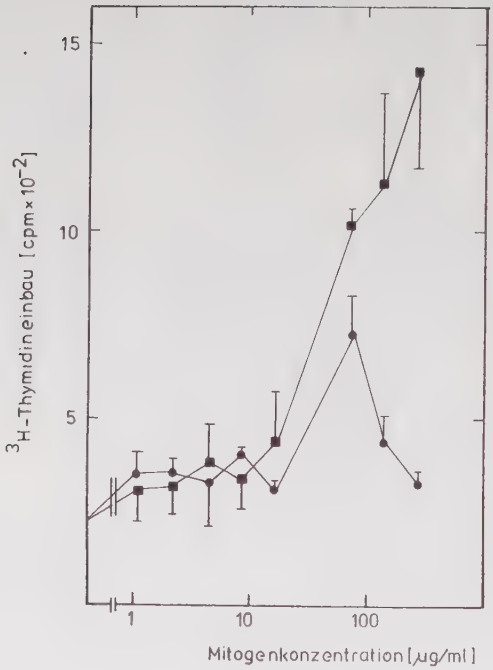


Abbildung 1a: Dosis-Wirkungskurven für CNBr 1 und Trypsinfragmente von CNBr 1

Milzlymphozyten wurden zusammen mit den zu testenden Substanzen 24 Stunden bei 37°C vorinkubiert und anschließend weitere 24 Stunden mit ^{3}H-Thymidin markiert. Es wurden folgende Symbole verwendet: (■——■) für CNBr 1 und (●——●) für Trypsinfragmente von CNBr 1.

3.3.1.4. Einfluß von Anti-Protein I-Seren bzw. Anti-CNBr 1-Seren auf die Stimulation von Milzlymphozyten

Für Con A, PHA und Lipoprotein konnte gezeigt werden, daß Antiseren gegen diese Mitogene, die Stimulation von Milzlymphozyten spezifisch hemmen (85,86). Hier sollte nun untersucht werden, ob Anti-Protein I- bzw. Anti-CNBr 1-Seren ebenfalls in der Lage sind, die Stimulation mit Protein I bzw. CNBr 1 von Milzzellen zu inhibieren. Dazu wurden den Mitogenverdünnungen inaktivierte (3o Minuten bei 56°C) Anti-Protein I-Seren bzw. Anti-CNBr 1-Seren zugefügt (Endkonzentration o,1%) und diese eine Stunde bei 37°C vorinkubiert. Im Anschluß daran wurde eine Milzzellsuspension zugegeben (Vergl. 2.4.1.4.) und nach 24 Stunden Inkubationszeit mit ^{3}H-Thymidin markiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt. Die Stimulation von Milzlymphozyten durch Protein I kann durch Zugabe von o,1% Maus-Anti-Protein I-Serum um etwa 43% gehemmt werden(Abb. 11). Sowohl Maus-Anti-Protein I-Seren als auch Maus-Anti-CNBr 1-Seren sind in der Lage, die Stimulation von Milzzellen durch CNBr 1 zu hemmen (Abb. 12).

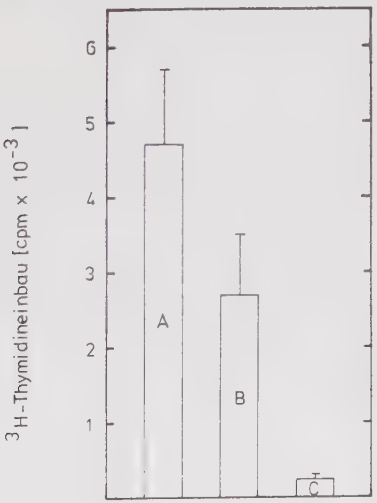


Abbildung 11: Hemmung der Stimulation von Protein I durch Maus-Anti-Protein I-Seren
Die Proteinkonzentration betrug 273 ug/ml. Säule A zeigt die Stimulation mit Protein I, Säule B die Stimulation mit Protein I und o,1% Maus-Anti-Protein I-Serum und Säule C die Stimulàtion mit o,1% Maus-Anti-Protein I-Serum.
Die Kontrolle ohne Serum betrug 235 ± 98 cpm.

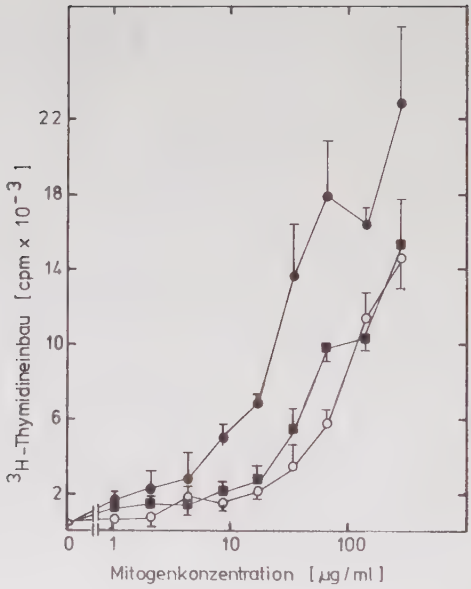


Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurve zur Hemmung der Stimulation von CNBr 1 mit Maus-Anti-Protein I-Seren und mit Maus-Anti-CNBr 1-Seren

Es wurden folgende Symbole verwendet: (●——●) für die Stimulation mit CNBr 1, (○——○) für die Stimulation mit CNBr 1 und o,1% Maus-Anti-Protein I-Serum und (■——■) für die Stimulation mit CNBr 1 und o,1% Maus-Anti-CNBr 1-Serum.

3.3.1.5. Dosis-Abhängigkeit von Protein I und Protein I-Fragmenten bei der Stimulation von Milzzellen aus "nackten" Mäusen

Nackte Mäuse sind durch ein angeborenes Fehlen des Thymus nicht in der Lage, aus T-Vorläufer Zellen funktionelle T-Lymphozyten zu bilden (87). Die Untersuchung der mitogenen Aktivität von Protein I und Protein I-Fragmenten auf Milzlymphozyten einer C3H/Tif/Bom nu nu Maus, sollte Aufschluß darüber geben, ob die durch diese Mitogene induzierte Stimulation von der Anwesenheit funktioneller T-Lymphozyten abhängt. Als Vergleichsexperiment wurde die Wirkung von Con A auf Milzlymphozyten einer C3H/ Tif/ Bom nu nu Maus untersucht, da Con A als T-Zell-Mitogen bekannt ist (88). Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 wiedergegeben.
Wie aus Abb. 13 hervorgeht, ist durch Stimulation mit Protein I eine gute Aktivierung von Milzlymphozyten einer C3H/Tif/Bom nu nu Maus zu erreichen. CNBr 1 hat einen geringeren Effekt, während die verwendete Mischung aus niedermolekularen CNBr-Fragmenten von Protein I und Con A kaum stimulierende Wirkung zeigen.

3.3.1.6. Stimulation von Thymozyten

Zur Untersuchung der Wirkung von Protein I und CNBr 1 auf Thymozyten, wurden Thymen aus Balb/c Mäusen entnommen (2.4.1.2.). Eine Stimulation mit Con A wurde als Vergleichsexperiment durchgeführt. Abbildung 14 zeigt die Dosis-Wirkungskurven für die drei Mitogene. Con A hat auf Thymozyten einen geringen Effekt (Vergl. Abb. 14), während Protein I und CNBr 1 keinen Effekt haben.

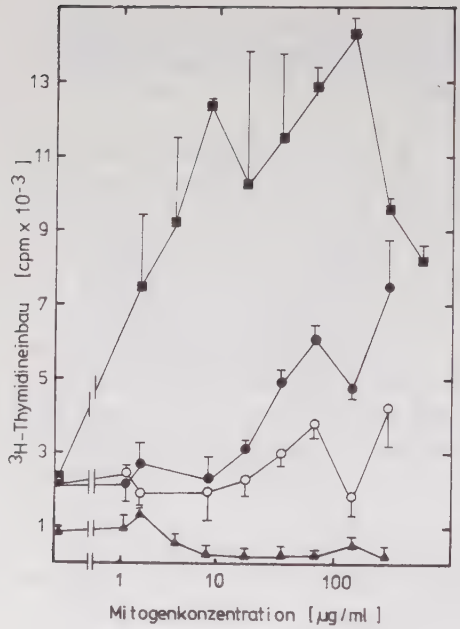


Abbildung 13:
Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von Milzlymphozyten einer C3H/Tif/Bom nu nu Maus nach der Stimulation mit Protein I (■——■), CNBr 1 (●——●), einer Mischung von niedermolekularen CNBr-Fragmenten von Prot.I (○——○) und Con A (▲——▲). Das Experiment verlief über 48 Stunden.

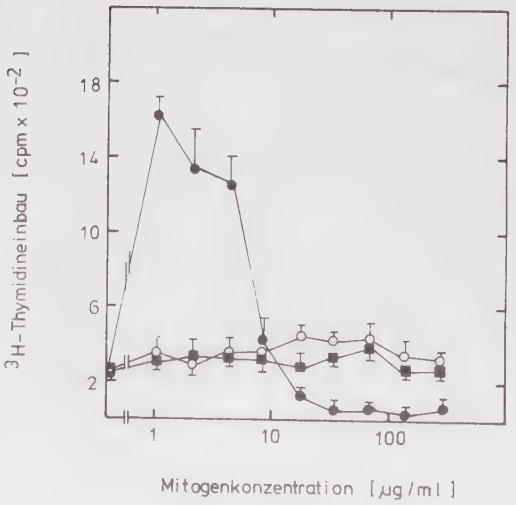


Abbildung 14:
Stimulation von Balb/c Thymozyten mit ProteinI CNBr 1 und Con A. Die Stimulation wurde insgesamt über 48 Stunden durchgeführt, wobei die verwendete Zellkonz. 1 x $1o^7$/ml betrug.
(●——●) Con A
(■——■) Protein I
(○——○) CNBr 1

3.3.2. Untersuchung der Stimulation von getrennten Lymphozytenpopulationen unter Einwirkung von Protein I und Fragmenten von Protein I

Um die Wirkung von Protein I bzw. Fragmenten von Protein I auf getrennte Lymphozytenpopulationen zu testen, wurden Zelltrennungen durchgeführt. Es wurden adhärente Zellen aus einer Milzlymphozyten-Population entfernt (Vergl. 3.3.2.1. und 3.3.2.2.) und versucht, B- und T-Lymphozyten zu trennen (Vergl. 3.3.2.3. und 3.3.2.4.).

3.3.2.1. Stimulation nach Entfernen von Makrophagen durch Adhärenz an Plastik

Makrophagen und reife B-Lymphozyten können durch Adhärenz an Plastik-Petrischalen aus einer Milzlymphozyten-Population entfernt werden (Vergl. 2.4.1.5.1.). Die Milzlymphozyten wurden 3 mal in Petrischalen inkubiert, um Makrophagen adhärieren zu lassen und die Stimulation mit Protein I und Con A des jeweiligen Überstandes untersucht. Tabelle 6 zeigt die prozentualen Anteile adhärierter Milzzellen.

Tabelle 6: Adhärenz von Milzzellen an Plastik-Petrischalen

	nicht adh. Zellen im Überstand	% adh. Zellen
Ausgangszellzahl	$3{,}5 \times 10^7$	-
Zellzahl nach 1 x 45 Min. Inkubation bei 37°C	$2{,}2 \times 10^7$	37,2
Zellzahl nach 2 x 45 Min. Inkubation bei 37°C	$2{,}1 \times 10^7$	5
Zellzahl nach 3 x 45 Min. Inkubation bei 37°C	$2{,}07 \times 10^7$	2

Abbildung 15 zeigt die Stimulation von Milzlymphozyten und den jeweiligen nicht adhärenten Zellen im Überstand (Vergl. Tabelle 6) mit Con A. Die Stimulation mit Protein I für eine Proteinkonzentration von 273 µg/ml wird in Abb. 16 dargestellt.

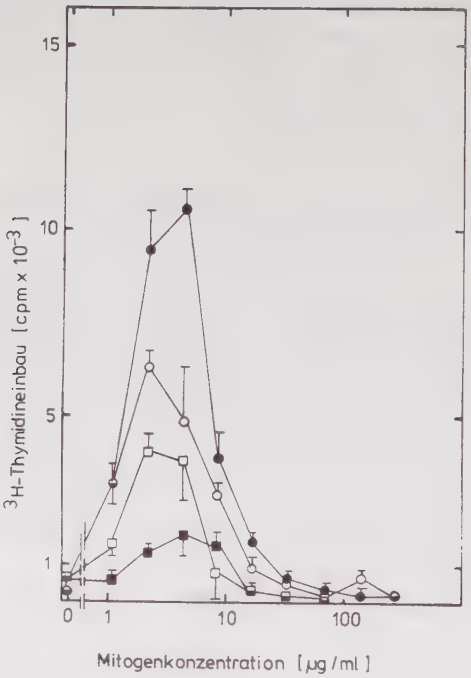


Abbildung 15: Stimulation von Lymphozyten mit Con A
Für die Dosis-Wirkungskurven wurden folgende Symbole verwendet: (○——○) für Milzlymphozyten, (●——●) für Milzlymphozyten nach 1 x 45 Min. Adhärenz an Plastik, (□——□) für Milzlymphozyten nach 2 x 45 Min. Adhärenz an Plastik und (■——■) für Milzlymphozyten nach 3 x 45 Min. Adhärenz an Plastik. Die Zellzahl wurde jeweils auf 3,3 x 10^6 Zellen/ml eingestellt. Das Experiment verlief über 48 Stunden.

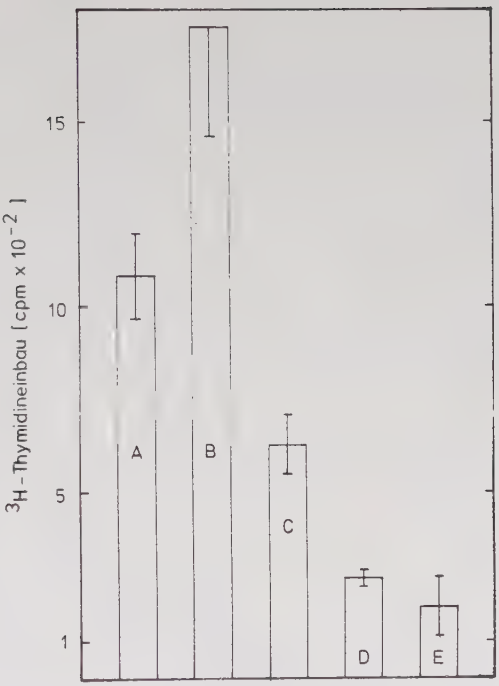


Abbildung 16: Stimulation von Lymphozyten mit Protein I

Es wurden 273 µg/ml Protein zur Stimulation eingesetzt. Die Stimulation von Milzlymphozyten wird durch Säule A angegeben, die Stimulation von Milzzellen nach 1 x 45 Min. Adhärenz an Plastik durch Säule B, die Stimulation von Milzzellen nach 2 x 45 Min. Adhärenz an Plastik durch Säule C und die Stimulation von Milzzellen nach 3 x 45 Min. Adhärenz an Plastik durch Säule D. Säule E zeigt ein Kontrollexperiment mit Milzzellen ohne Mitogen. Die Zellzahl wurde jeweils auf 3,3 x 10^6/ml eingestellt. Die Gesamtinkubationszeit betrug 48 Stunden.

Wie aus den Abbildungen 15 und 16 zu entnehmen ist, sind nicht adhärente Milzlymphozyten, die 45 Minuten in Plastik-Petrischalen kultiviert wurden durch Con A und Protein I besser stimulierbar. Mit steigender Anzahl an Inkubationsschritten auf Plastik-Petrischalen verlieren Milzzellsuspensionen allmählich die Fähigkeit auf Con A und Protein I zu antworten.

Mischt man einer Zellpopulation, die vorher von adhärenten Zellen befreit worden war, dagegen wieder Makrophagen zu, so ist diese neue Zellpopulation sehr wohl durch Con A und Protein I stimulierbar. Das geht aus den Abbildungen 17 und 18 hervor. Eine Milzlymphozytenkultur wurde durch dreimalige Adhärenz an Plastik-Petrischalen weitgehend von Makrophagen befreit. Die Makrophagen wurden durch Ablösen mit einem "Molekülbesen" von den Plastik-Petrischalen und durch Nachspülen mit MEM gewonnen. Der von adhärenten Zellen befreiten Zellsuspension wurden 1o% der abgelösten Makrophagen zugesetzt und die Stimualtion dieser Zellen mit Protein I und Con A getestet.

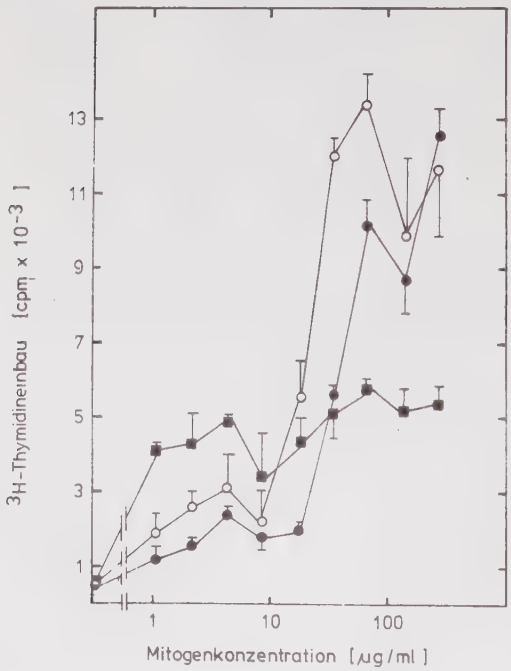


Abbildung 17:
Stimulation von verschiedenen Zellpopulationen mit Protein I (●——●) Milzzellen (■——■) eine von adhärenten Zellen befreite Milzzell-Population und (○——○) eine von adhärenten Zellen befreite Zellpopulation, der 1o% Makrophagen zugefügt wurden. Die Stimulation wurde durch ^{3}H-Thymidin einbau in die DNA der Lymphozyten gemessen.

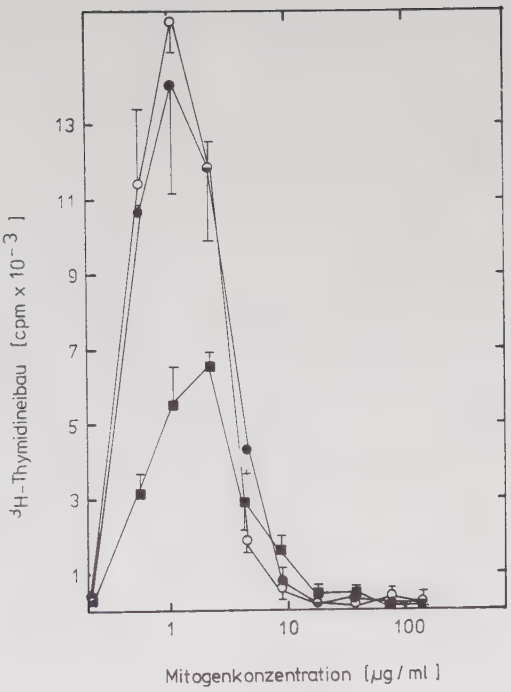


Abbildung 18: Stimulation von verschiedenen Zellpopulationen mit Con A

Es wurden folgende Symbole verwendet: (●——●) für Milzzellen, (■——■) für eine von adhärenten Zellen befreite Milzzellpopulation und (○——○) für eine von adhärenten Zellen befreite Milzzellpopulation, der 1o% Makrophagen zugefügt wurden. Die Stimualtion (48 Stunden) wurde durch ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA der Lymphozyten gemessen.

3.3.2.2. Stimulation nach Entfernen von adhärenten Zellen durch Chromatographie über Sephadex G 1o

Über eine Sephadex G 1o-Säule können Milzlymphozyten-Populationen getrennt werden (Vergl. 2.4.1.5.2.). Dabei binden vor allem Makrophagen und antikörperbildende B-Lymphozyten an Sephadex G 1o während T-Lymphozyten und unreife B-Zellen die Säule passieren können. Auf diese Weise getrennte Zellpopulationen wurden mit Protein I und Con A stimuliert, um die Notwendigkeit von Makrophagen bzw. reifen B-Lymphozyten zur Auslösung einer polyklonalen Immunantwort aufzuzeigen. In den Abbildungen 19 und 2o sind Dosis-Wirkungskurven für Protein I und Con A dargestellt. Wie man aus diesen Abbildungen entnehmen kann, ist die Immunantwort für beide Mitogene nach Passage über eine Sephadex G 1o Säule deutlich verringert. Die mitogene Stimulation konnte noch weiter verringert werden, indem man vor dem Auftragen auf die Säule, die verwendeten Milzzellen 1 x 45 Min. bei 37°C an eine Plastik-Petrischale adhärieren ließ und den Überstand auf die Säule auftrug. Dies zeigen die Abbildungen 21 und 22. Eine Übersicht über die eingesetzten Zellzahlen in den genannten Experimenten ist aus Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Übersicht über die Zellausbeute nach Passage über Sephadex G 1o

Exp. Nr.		Nicht adh. Zellen im Überstand	% adh. Zellen
1	Ausgangszellzahl	$7{,}6 \times 10^7$	-
	Zellzahl nach Pass. Über Seph. G 1o	$3{,}2 \times 10^7$	57,9
2	Ausgangszellzahl	$8{,}6 \times 10^7$	-
	Zellzahl n. 1x45 Min. Adh. an Plastik	$7{,}9 \times 10^7$	8,2
	Zellzahl n. G 1o	$4{,}4 \times 10^7$	43,2
3	Ausgangszellzahl	$2{,}7 \times 10^8$	-
	Zellzahl n. G 1o	1×10^8	62,9

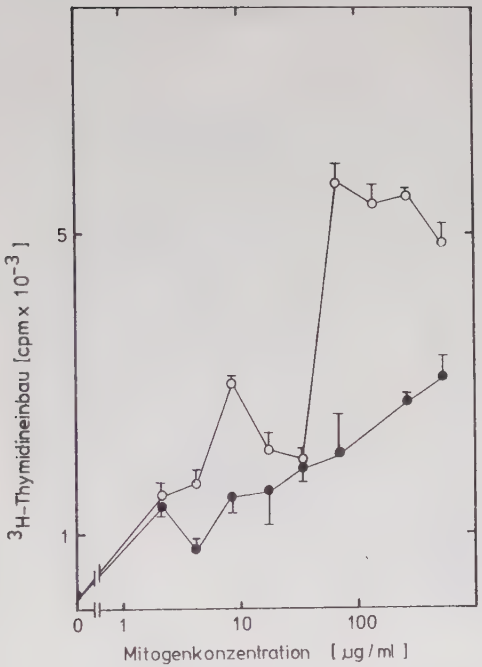


Abbildung 19: Dosis-Wirkungskurven für Protein I
Die Kurven zeigen die Stimulation von Milzzellen (o——o) und von Milzzellen nach Passage über Sephadex G 1o (●——●). Die Zellen wurden 24 Stunden mit Protein I vorinkubiert und weitere 24 Stunden mit ^{3}H-Thymidin markiert.

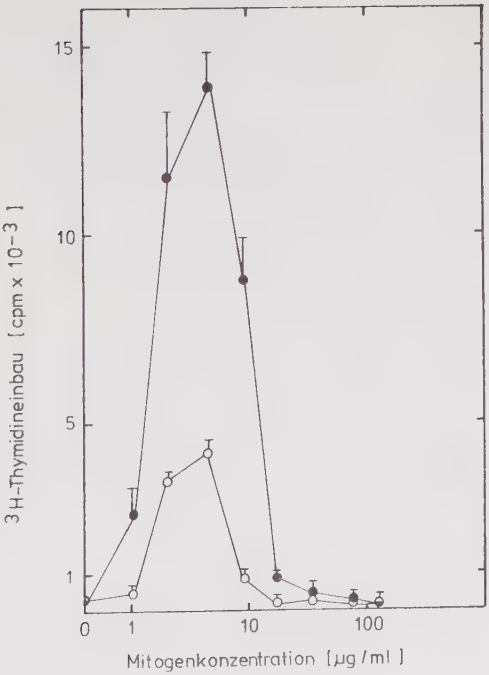


Abbildung 2o: Dosis-Wirkungskurven für Con A
(●——●) Milzzellen,
(o——o) Milzzellen nach Passage über Sephadex G 1o
Die Zellen wurden 24 Stunden mit Con A vorinkubiert und weitere 24 Stunden mit ^{3}H-Thymidin markiert.

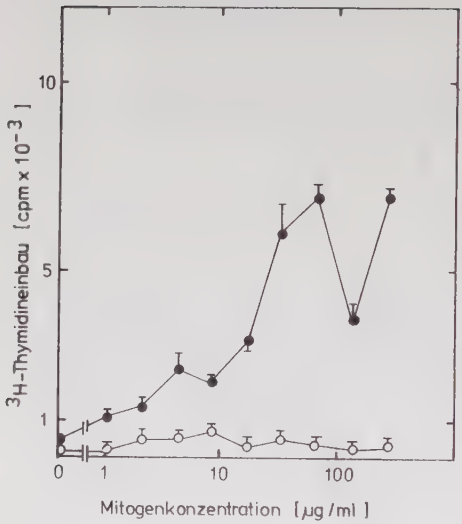


Abbildung 21: Dosis-Wirkungskurven für Protein I
Es wurden folgende Symbole verwendet: (●——●) für Milzzellen nach 1x45 Min. Adhärenz an Plastik und (o——o) für Milzlymphozyten nach Passage über Sephadex G 1o. Die Gesamtinkubationszeit betrug 48 Stunden.

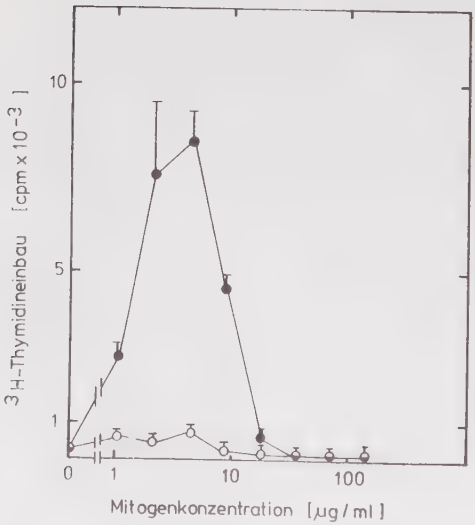


Abbildung 22: Dosis-Wirkungskurven für Con A (●——●) Milzzellen nach 1x45 Min. Adhärenz an Plastik und (o——o) Milzlymphozyten nach Passage über Sephadex G 1o.

3.3.2.3. Stimulation von mit SBA getrennten Lymphozyten

Diese Methode zur Zelltrennung (Vergl. 2.4.1.6.2.) basiert auf der unterschiedlichen Agglutination von Lymphozytensubpopulationen mit Sojabohnen-Agglutinin. B-Lymphozyten werden mit Sojabohnen-Agglutinin verklumpt, während T-Lymphozyten mit SBA keine Reaktion zeigen. Die erhaltenen B-Zell-Aggregate wurden durch Sedimentation in FCS getrennt und in einzelne Zellen dissoziiert durch Zugabe von D-Galaktose, die einen Hapten-Inhibitor von Sojabohnen-Agglutinin darstellt. Die erhaltenen Zellfraktionen wurden durch ihre Antwort auf verschiedene Mitogene charakterisiert. B-Lymphozyten und Milzzellen antworten in gleicher Weise auf Protein I, während T-Lymphozyten eine schwächere Antwort zeigen.(Abb. 23). Beispiele zur erhaltenen Zellausbeute sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8:Übersicht über die Zellausbeute bei Zelltrennungen mit SBA

Exp.Nr.		Zellausbeute gesamt	Zellausbeute in%
1	Ausgangszellzahl	2×10^8	100
	B-Zell-Fraktion	$5,3 \times 10^7$	26,5
	T-Zell-Fraktion	$1,8 \times 10^7$	9
2	Ausgangszellzahl	$1,5 \times 10^8$	100
	B-Zell-Fraktion	$6,2 \times 10^7$	41,3
	T-Zell-Fraktion	$2,8 \times 10^7$	18,6
3	Ausgangszellzahl	$3,3 \times 10^8$	100
	n. Entf. d. Ery.	$1,2 \times 10^8$	36,3
	B-Zell-Fraktion	$5,1 \times 10^7$	43
	T-Zell-Fraktion	$1,6 \times 10^6$	14
4	Ausgangszellzahl	$1,4 \times 10^8$	100
	Zellen n. Adh.	$7,9 \times 10^7$	56,4
	B-Zell-Fraktion	$2,4 \times 10^7$	30,3
	T-Zell-Fraktion	$1,5 \times 10^7$	18,9

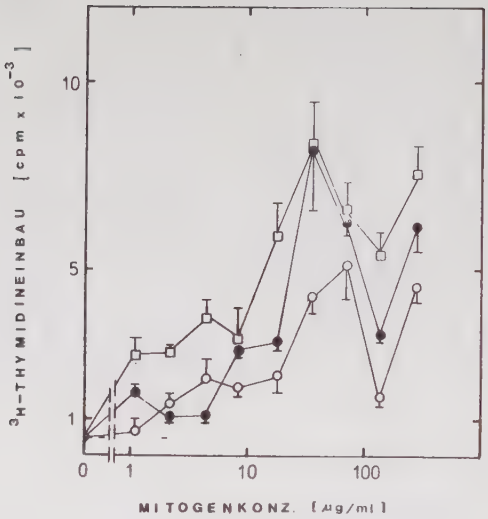


Abbildung 23: Dosis-Wirkungskurven für Protein I Stimulation von Milzzellen nach 1 x 45 Min. Adhärenz an Plastik-Petrischalen (□——□), Stimulation einer mit SBA gewonnenen B-Lymphozyten-Fraktion (●——●) und Stimulation einer mit SBA gewonnenen T-Lymphozyten-Fraktion (○——○).

3.3.2.4. Stimulation von mit Nylonwolle getrennten Lymphozyten

Eine gängige Methode, angereicherte T-Lymphozyten- bzw. B-Lymphozyten-Fraktionen zu gewinnen, ist die Passage von Milzlymphozyten über Nylon-Wolle-Säulen. B-Lymphozyten und Makrophagen adhärieren zum größten Teil an Nylonwolle, während T-Lymphozyten die Säule passieren.
B- und T-Zell-Populationen aus Balb/c Milzen wurden wie im Abschnitt 2.4.1.6.3. beschrieben gewonnen, um die Wirkung von Protein I auf diese Populationen zu untersuchen.

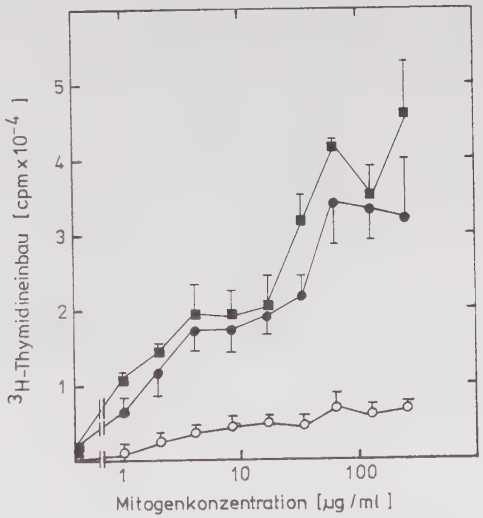


Abbildung 24: ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA von Milzzellen sowie von Milzzellpopulationen unter Einwirkung von Protein I

Die Stimulation von Milzlymphozyten (■——■), einer B-Zell-Subpopulation (●——●) und einer T-Zell-Subpopulation (○——○) wurden untersucht.

Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 24 und 25 wiedergegeben. Daraus geht hervor, daß Protein I auf Milzlymphozyten und eine angereicherte B-Zell-Population stimulierend wirkt, dagegen auf eine angereicherte T-Zell-Population keine Wirkung zeigt. Con A (Vergl. Abb. 25) hat auf alle drei Zellpopulationen einen stimulierenden Effekt.

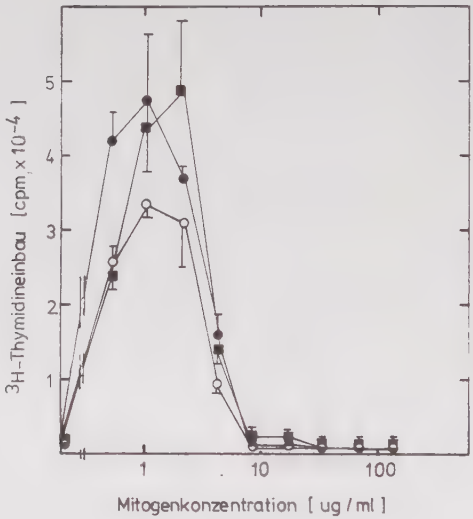


Abbildung 25: ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA von verschiedenen Zellpopulationen unter Einwirkung von Con A
Es wurden folgende Symbole verwendet: (■——■) für Milzlymphozyten, (●——●) für eine B-Zell-Fraktion und (○——○) für eine T-Zell-Fraktion.

3.3.3. Untersuchung der Antikörpersekretion von B-Lymphozyten nach Einwirkung von Protein I bzw. seiner Fragmente

Die Antikörpersekretion von B-Lymphozyten nach Stimulation mit Protein I bzw. mit Protein I-Fragmenten konnte mit Hilfe der im Abschnitt 2.4.2. beschriebenen Plaque-Test-Methoden bestimmt werden.

3.3.3.1. Zeitabhängigkeit nach Stimulation in vitro

Die Stimulation von Milzlymphozyten mit Protein I und CNBr 1 wurde wie unter 2.4.2. beschrieben durchgeführt. Zur Ermittlung der optimalen Stimulationszeit wurde die Antikörpersekretion der stimulierten Zellen nach Inkubationszeiten von 1,3,4,5 und 7 Tagen bestimmt. Der Plaque-Test wurde mit TNP-beschichteten Erythrozyten durchgeführt (Vergl. 2.4.2.1.), wie aus Abb. 26 zu entnehmen ist. Für Protein I konnten nach 3-4 Tagen Stimulation optimale Plaque-Zahlen ermittelt werden, für CNBr 1 lag das Optimum bei 3 Tagen Stimulation.

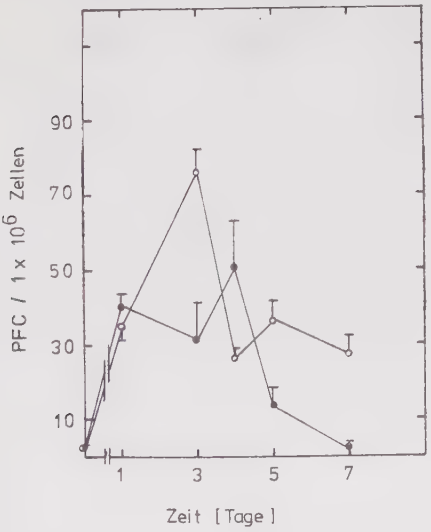


Abbildung 26:
Antikörpersekretion von B-Lymphozyten nach Stimulation mit Protein I und CNBr 1 - Zeitabhängigkeit
(●——●) Protein I als Mitogen (273 ug/ml) und
(○——○) CNBr 1 als Mitogen (273 ug/ml). Der Plaque-Test wurde mit TNP-beschichteten Erythrozyten durchgeführt.

3.3.3.2. Dosis-Abhängigkeit nach Stimulation in vitro

In den folgenden Plaque-Tests wurde die Antikörpersekretion von B-Lymphozyten nach Stimulation mit Protein I, CNBr 1 und einer Mischung aus niedermolekularen CNBr-Fragmenten von Protein I untersucht. Die Zellen wurden vor ihrer Verwendung im Plaque-Test jeweils 3 Tage mit den zu untersuchenden Proben stimuliert. Abb. 27 zeigt Dosis-Wirkungskurven für die drei beschriebenen Substanzen. Daraus geht hervor, daß sowohl Protein I als auch CNBr 1 in der Lage sind, B-Lymphozyten zur Antikörpersekretion zu stimulieren. Dagegen hat das Gemisch aus niedermolekularen CNBr-Fragmenten von Protein I keinen Einfluß auf B-Lymphozyten. Eine empfindlichere Methode zur Erfassung der antikörpersezernierenden Zellen, stellt der hämolytische Plaque-Test mit Protein A-beschichteten Erythrozyten dar. Bei diesem Test wurde ein Kaninchen-Anti-Maus-Immunoglobulin-Serum als Entwicklungsserum verwendet, das Dr. R.B. Johnson freundlicherweise zur Verfügung stellte. Die Ergebnisse der Untersuchungen nach der Protein A-Plaque-Methode (Vergl. 2.4.2.2.) sind in Abb. 28 dargestellt.

3.3.3.3. Antikörpersekretion nach Stimulation in vivo

Um zu untersuchen, ob Protein I bzw. CNBr 1 auch in vivo einen Einfluß auf die Stimulation von B-Lymphozyten haben, wurden in Zusammenarbeit mit S. Köhl (89) je 35 ug/Maus Protein I und CNBr 1 intravenös injiziert. Nach 3 Tagen wurden den Mäusen die Milzen entnommen (Vergl. 2.4.1.1.) und die Lymphozyten für den Plaque-Test vorbereitet. Abb. 29 gibt Aufschluß über die Milzgewichte nach Stimulation von Protein I bzw. CNBr 1 im Vergleich zu nicht stimulierten Milzen (Kontrollen). Bei mit Protein I bzw. CNBr 1 stimulierten Mäusen sind die Milzgewichte deutlich höher als bei unstimulierten Mäusen.

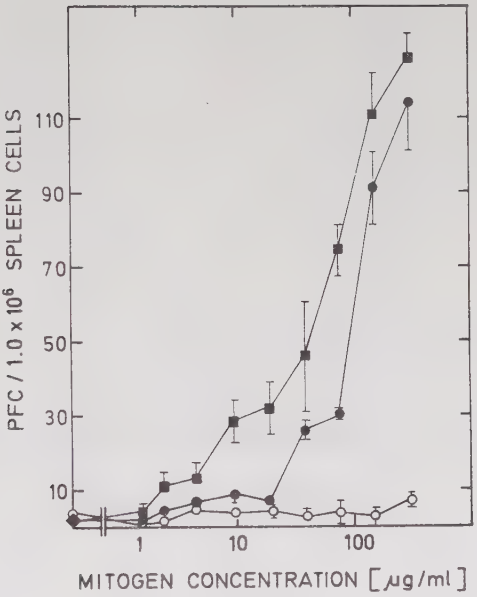


Abbildung 27: Antikörpersekretion von B-Lymphozyten nach der TNP-Plaque-Methode
Dosis-Wirkungskurven für Protein I (■——■), CNBr 1 (●——●) und für ein Gemisch aus niedermolekularen CNBr-Fragmenten von Protein I (○——○).

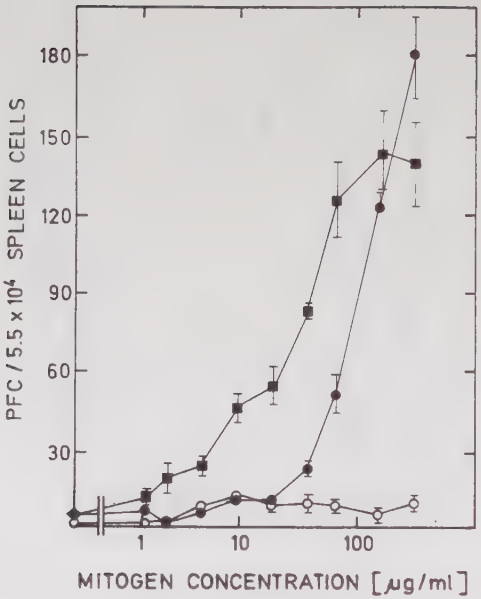


Abbildung 28: Antikörpersekretion von B-Lymphozyten nach der Protein A-Plaque-Methode
Dosis-Wirkungskurven für Protein I (■——■), CNBr 1 (●——●) und für ein Gemisch aus niedermolekularen CNBr-Fragmenten von Protein I (○——○).

Mit den gewonnenen Milzlymphozyten wurde ein Plaque-Test durchgeführt, sowohl mit TNP-beschichteten Erythrozyten als auch mit unbeschichteten Erythrozyten (Abb. 3o I und II). Bei den Kontrollzellen sezernieren 12 von $1o^6$ Zellen Immunoglobulin, bei den mit Protein I stimulierten Zellen 41 von $1o^6$ Zellen und bei den mit CNBr 1 stimulierten Zellen 22 von $1o^6$ Zellen. Es wurde zusätzlich die Proliferation der verwendeten Lymphozyten durch Einbau von ^3H-Thymidin in die DNA der Zellen gemessen (Abb. 31). Mit Protein I oder mit CNBr 1 stimulierte Milzlymphozyten haben eine höhere Proliferationsrate als unstimulierte Lymphozyten.

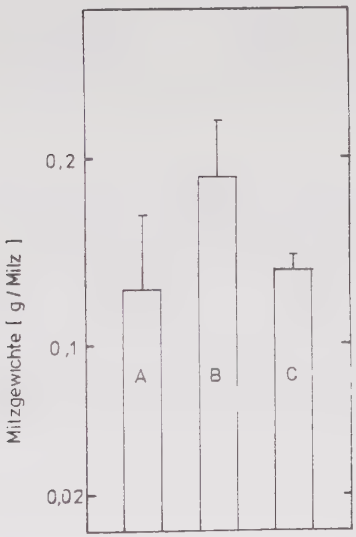


Abbildung 29: Stimulation von Milzlymphozyten in vivo - Milzgewichte
A = Kontrolltiere (unstimuliert)
B = Mit Protein I stimulierte Tiere
C = Mit CNBr 1 stimulierte Tiere.

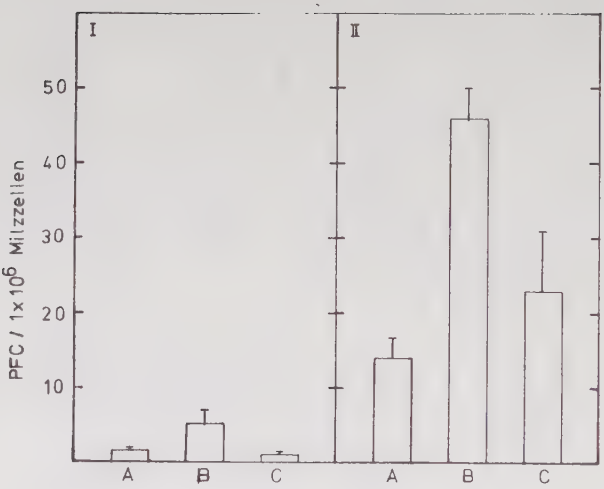


Abbildung 3o: Stimulation von B-Lymphozyten in vivo - Plaque-Test mit unbeschichteten Erythrozyten (I) und mit TNP-beschichteten Erythrozyten (II)

A = unstimulierte Lymphozyten

B = mit Protein I stimulierte Lymphozyten

C = mit CNBr 1 stimulierte Lymphozyten

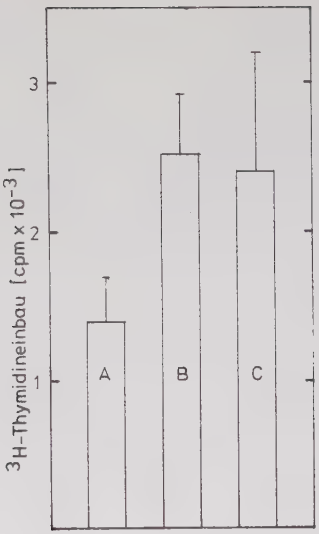


Abbildung 31: Stimulation von Milzlymphozyten in vivo - Proliferation

A = unstimulierte Lymphozyten

B = mit Protein I stimulierte Lymphozyten

C = mit CNBr 1 stimulierte Lymphozyten

Die Milzzellen wurden 24 Stunden mit ^{3}H-Thymidin markiert. Die angegebenen cpm-Werte sind Durchschnittswerte aus 1o Parallelansätzen.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde Protein I aus der äußeren Membran von Escherichia coli isoliert, gereinigt und mit CNBr in kleinere Fragmente gespalten. Die biologische Wirkung des Proteins und seiner Spaltstücke auf Mäuse-Lymphozyten verschiedener Stämme sowie auf Lymphozytensubpopulationen wurde untersucht.

Protein I konnte bereits aus verschiedenen Escherichia coli Stämmen isoliert werden (7,72,9o), z.B. E. coli B/r, E. coli BE, E. coli K 12 W62o und E. coli K 12 P4oo. E. coli K 12 W62o besitzt sowohl Protein Ia als auch Protein Ib. Diese beiden Proteine können nur unter speziellen Bedingungen elektrophoretisch getrennt werden (11,54), und durch Vergleich der Aminosäurenanalysen der CNBr-Fragmente der beiden Proteine wurde eine sehr ähnliche Aminosäurenzusammensetzung gefunden (91). C. Verhoef et al. (1o4) fanden jedoch, daß Protein Ia und Ib von verschiedenen Genen codiert werden und ihre Exprimierung durch einen gemeinsamen Mechanismus reguliert wird. Sie konnten zeigen, daß die Gesamtmenge von Protein Ia und Ib immer konstant ist (1o4). Aus den genannten Gründen wurde in dieser Arbeit ein Bakterienstamm (E. coli B/r) gewählt, der nur Protein Ia enthält. Die Primärstruktur von Protein Ia aus E. coli B/r wurde von Chen et al. (1o5) aufgeklärt.

Protein Ia wurde aus der äußeren Membran von Escherichia coli nach drei verschiedenen Methoden isoliert. Bei der ersten Methode wurden die Bakterien nach Rosenbusch (6) aufgeschlossen und die Membranen isoliert. Diese wurden weiter verarbeitet nach Hindennach und Henning (49), wobei die Ausbeute bei 11o mg Protein I pro 2oo g Bakterien-Feuchtgewicht lag. Dieses Material war nicht homogen, sondern enthielt noch andere Membranproteine als Verunreinigungen. Es konnte durch Säulenchromatographie (Vergl. 2.3.3.2.) weiter angereichert werden, was allerdings mit großen Verlusten verbunden war. Bei der zweiten

Methode wurde ausschließlich nach Hindennach und Henning (49) verfahren. Dabei betrug die Ausbeute nach der Trypsinbehandlung zur Entfernung von Protein-Verunreinigungen (Vergl. 2.3.2.) 1,5 g Protein I pro 2oo g Bakterien-Feuchtgewicht. Im Vergleich dazu erhielt U. Henning und Mitarbeiter (49) 2,o g pro 2oo g Bakterien-Feuchtgewicht. Das auf diese Weise gewonnene Material enthielt nur sehr wenige Protein-Verunreinigungen, die über Säulenchromatographie (2.3.3.2.) vollständig abgetrennt werden konnten. Allerdings enthielt das Protein I-Präparat etwa 3o% SDS, welches durch mehrmalige Aceton-Fällungen (49) entfernt werden mußte. Im Anschluß an die beschriebene Trypsinbehandlung wurde Protein I von der Arbeitsgruppe von U. Henning (49) über eine Biogel P 15o Säule gereinigt. Dabei konnten 12o mg Protein I pro 2oo g Bakterien-Feuchtgewicht von großer Reinheit erhalten werden. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit Gelchromatographie mit verschiedenen Ultrogel-Säulen durchgeführt, die aber ein vergleichbares Ergebnis erbrachte.
Bei der dritten Methode zur Isolierung von Protein I wurden die Bakterien mit Hilfe einer French-Press-Apparatur aufgeschlossen, anstatt mit Glasperlen (2.3.1.2.). Zusätzlich erfolgte nach dem Aufschluß der Bakterien ein Zentrifugationsschritt (5o Minuten bei 8.ooo rpm, SS 34 Rotor, Sorvall) zur Vorreinigung der Membranen (48). Nachdem die Membranen sedimentiert waren, wurde weiter nach der Methode von Hindennach und Henning (49) verfahren. Mit diesem Isolierungsverfahren konnten 7o mg Protein I pro 2oo g Bakterien-Feuchtgewicht erhalten werden. Die Ausbeute war vergleichsweise geringer, jedoch enthielt das Protein I-Präparat kaum Verunreinigungen. Es konnte ohne zusätzliche Gelchromatographie in Stimulationsexperimenten und zur Antiserumgewinnung eingesetzt werden.

Die verschiedenen Protein I-Präparate wurden durch Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert, wobei diese Methode auch zur Molekulargewichtsbestimmung herangezogen werden konnte. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, konnte für Protein I ein durchschnittliches Molekulargewicht von 35.8oo (Vergl. Tabelle 1) ermittelt werden. Beispielsweise fand Rosenbusch (6) 1974 für Protein I ein Molekulargewicht von 36.5oo, Garten (9o) fand 1974 ein Molekulargewicht von 4o.ooo; und 1975 konnten Hindennach und Henning (49) ein Molekulargewicht von 38.ooo ermitteln. In den Jahren 1978-1981 konnten folgende Molekulargewichte für Protein I bestimmt werden: 37.ooo (Palva und Randall, 21), 38.ooo (Yu et al., 2o), 37.2o5 (Chen et al., 7) und 35.ooo (Goldman et al., 92).

Zur Optimierung der abschließenden Reinigung des Protein I-Präparates durch Säulenchromatographie wurden Ultrogele AcA mit verschiedenen Porengrößen erprobt (Abb. 2). Protein I konnte hierbei mit Ultrogel AcA 34 (Ausschluß bis MW 75o.ooo) in elektrophoretisch reiner Form gewonnen werden, und die erhaltenen Elutionsprofile (Abb. 2B) entsprechen weitgehend den Ergebnissen von Hindennach und Henning (49), die Protein I über Biogel P 15o gereinigt haben. Die Trennung von Protein I über Ultrogel AcA 44 (Ausschluß bis MW 2oo.ooo) und AcA 22 (Ausschluß bis MW 3.ooo.ooo) erbrachte keine befriedigenden Ergebnisse. Alle Gelchromatographien wurden bei einer konstanten Temperatur von 27°C durchgeführt. W. Garten (9o) konnte jedoch in seiner Arbeit eine gut reproduzierbare Proteinauftrennung erst oberhalb eines konstanten Temperaturwerts von 3o°C erreichen. Eine Temperaturabhängigkeit des Elutionsverhaltens von Protein I durch Aggregatbildung, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, doch stellt die

Möglichkeit der Verschiebung des Protein I-Peaks durch die Bildung von verschieden großen Protein I-Aggregaten in Abhängigkeit zur Temperatur einen weiteren interessanten Aspekt zur Reinigung und Gewinnung von Protein I mit Hilfe von Gelfiltrationen dar.

Proteine, die Methioninreste enthalten, können mit CNBr in kleinere Peptide zerlegt werden. Diese Methode wurde bei Protein I angewandt, um zusätzlich Aufschluß über die Homogenität der Protein I-Präparate zu erhalten und um auf diese Weise Spaltstücke zu erhalten, deren mitogene Aktivität zu prüfen war. Erste Vorversuche dazu wurden mit Lipoprotein durchgeführt. Lipoprotein hat ein Molekulargewicht von etwa 7.000 (5), enthält 2 Methioninreste und ist damit mit CNBr in 3 kleinere Peptide spaltbar. Eines davon besteht aus nur 5 Aminosäuren, die beiden anderen haben Molekulargewichte zwischen 3.000 und 4.000. Die Spaltung von Lipoprotein wurde durchgeführt, wie in den Abschnitten 2.3.4. und 2.3.4.1. beschrieben. Es konnten 3 Spaltstücke nachgewiesen werden. Aufgrund einer zu geringen Ausbeute wurden sie jedoch nicht näher charakterisiert.
Die CNBr-Spaltung von Protein I wurde in gleicher Weise (2.3.4. und 2.3.4.1.) im Zeitraum von 16 bis 2o Stunden in 7o prozentiger Ameisensäure oder 7o prozentiger Trifluoressigsäure durchgeführt. W. Garten (9o) konnte zeigen, daß Protein I in 7o prozentiger Ameisensäure bei 37°C bis zu 24 Stunden nicht hydrolysiert wird. Erst bei längerem Einwirken (36 - 48 Stunden) tritt merklicher hydrolytischer Zerfall ein. Die Vollständigkeit der CNBr-Spaltung geht aus Abbildung 7 (A) hervor, wo im Molekulargewichtsbereich von 35.000 bis 37.000 keine Proteinbande mehr sichtbar ist. Außerdem kann nach W. Garten (9o) als sicher angenommen werden, daß die CNBr-Spaltung innerhalb einer Dauer von 3 bis 4 Stunden vollständig ist. Das erhaltene Banden-

muster (Vergl. Abb. 7) der Spaltstücke von Protein I ist nicht mit den von W. Garten gefundenen Proteinbanden vergleichbar, da zur Analyse der Spaltstücke völlig unterschiedliche Gelsysteme verwendet worden sind. In einer Arbeit von Gamon et al. (72) wurde ein Proteinmuster von CNBr-Fragmenten von Protein I veröffentlicht, das ähnliche Banden wie in Abbildung 7 aufweist.
Eine Trennung der erhaltenen CNBr-Fragmente über eine Ultrogel AcA 54 Säule in 8 M Harnstoff war erst nach Citraconylierung der Fragmente möglich (71). Laut Chen et al. (71) sollte mit dieser Methode eine Trennung in 6 verschiedene Fragmente erzielt werden, wobei 2 davon Aggregate aus unvollständig gespaltenen Molekülen darstellen. Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, konnten in dieser Arbeit nur 3 verschiedene Fragmente sauber getrennt werden (Abb. 5, A,B,C). Die Arbeitsgruppe um U. Henning (7) kam zu den selben Resultaten und fand, daß selbst nach Citraconylierung die CNBr-Fragmente noch sehr leicht Aggregate bildeten und daher die Gelchromatographie zur Trennung dieser Spaltstücke zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen führen kann (7). Das größte CNBr-Fragment von Protein I (CNBr 1) konnte sehr sauber von den übrigen Spaltstücken abgetrennt und durch Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert werden (Vergl. Abb. 6). Sein Molekulargewicht (Durchschnittswert, Vergl. Tabelle 2) beträgt 21.4oo, der rechnerische Wert, der mit Hilfe der angegebenen Primärstruktur von Protein I (7) ermittelt wurde, liegt bei 24.ooo.

Eine Reihe verschiedener Substanzen, z. B. pflanzliche Lektine, bakterielle Komponenten, Antiseren, proteolytische Enzyme usw. haben mitogene Eigenschaften und besitzen somit die Fähigkeit, Lymphozyten unabhängig von ihrer Spezifität zur Differenzierung und Proliferation zu stimulieren (93). Anfang der sechziger Jahre

wurde erkannt, daß Phytohämagglutinin (PHA) in vitro menschliche Leukozyten zur Proliferation stimuliert (93). N. Sharon (94) hat die Bindung von anderen Lektinen an B-Lymphozyten oder T-Lymphozyten und eine dadurch ausgelöste mitogene Stimulation beschrieben. Während pflanzliche Lektine (z.B. Con A, PHA usw.) in der Hauptsache T-Lymphozyten stimulieren, zeigen bakterielle Komponenten wie LPS oder Lipoprotein (95) auf B-Lymphozyten mitogene Eigenschaften. Bei LPS und Lipoprotein werden jeweils die Lipidanteile der beiden Moleküle für die Mitogenität verantwortlich gemacht (96,97). Es wurde aber auch ein Protein, das PPD (Purified Protein Derivative) aus Tuberkulin als B-Zell-Mitogen beschrieben (98,99). In dieser Arbeit wurde ebenfalls die biologische Wirkung eines Proteins - des Protein I und seiner Spaltstücke aus der äußeren Membran von Escherichia coli - auf Leukozyten und auf getrennte Lymphozytenpopulationen verschiedener Mäusestämme untersucht. Protein I war bereits von W.G. Bessler und U. Henning (1oo) als Mitogen beschrieben worden. Bei der Durchführung von Stimulationsexperimenten mußte zunächst für die zu testenden Substanzen eine optimale Inkubationszeit ermittelt werden. Das für Protein I und CNBr 1 gefundene Optimum bei 48 Stunden (Vergl. Abb. 8) stimmt mit den Daten von Bessler und Henning (1oo) für Protein I und Protein II* und mit den Ergebnissen von Sultzer (98) für PPD überein. Ebenfalls vergleichbar mit den Ergebnissen von Bessler und Henning (1oo) sind die in Tabelle 3 angegebenen Dosis-Abhängigkeiten der Stimulation von Milzzellen aus C3H/HeJ-Mäusen (antworten nicht auf LPS) mit den Mitogenen Protein I, CNBr 1 und Con A.

Bei der Stimulation von Balb/c Mäusen, einem Mäusestamm, der auf LPS antwortet, wurde die Wirkung von Protein I, CNBr 1 und einer Mischung aus niedermolekularen CNBr-Fragmenten von Protein I auf Milzlymphozyten verglichen.

Aus der Tatsache, daß CNBr 1 einen vergleichbaren stimulierenden Effekt wie das gesamte Protein I Molekül hat, (Abb. 9, Tabelle 4 und 5) kann man schließen, daß dieses Proteinfragment, den für die Mitogenität verantwortlichen Teil darstellt. Im Gegensatz dazu haben kleinere CNBr-Fragmente (Abb. 9) und Trypsinfragmente von CNBr 1 (Abb. 1o) eine geringere bzw. keine mitogene Wirkung auf Balb/c Milzzellen. Dieser Befund kann damit erklärt werden, daß ein Peptid nur über seine definierte Tertiärstruktur mit komplementären Strukturen der Lymphozytenmembran in Wechselwirkung treten kann und dadurch eine Differenzierung und Proliferation der entsprechenden Zellen auslösen kann.

Von M.A. Leon konnte gezeigt werden (58), daß die mitogene Stimulation von T-Lymphozyten mit Con A durch die Zugabe eines Anti-Con A-Serums inhibiert werden kann. Auch die PHA-induzierte Proliferation läßt sich durch Anti-PHA-Seren spezifisch hemmen (86). Dasselbe konnte für Lipoprotein (95) gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde versucht, die Stimulation durch Protein I mit Hilfe eines Maus-Anti-Protein I-Serums (Abb. 11) und eines Kaninchen-Anti-Protein I-Serums zu inhibieren. Die Spezifität der beiden Antiseren konnte wegen dem schlechten Löslichkeitsverhalten von Protein I nicht im Ouchterlony-Test (Vergl. 2.2.5.) nachgewiesen werden, wohl aber mit Hilfe der radialen Immundiffunsion nach Mancini (Vergl. 2.2.6.) und mit Hilfe eines Hämagglutinationstests (Vergl. 2.2.7.). Mit dem Kaninchen-Anti-Protein I-Serum konnte keine Hemmung der Stimulation durch Protein I erzielt werden, da dieses Serum selbst proliferationsinduzierende Wirkung zeigte. Dagegen konnte die Stimulation durch Protein I mit o,1% Maus-Anti-Protein I-Serum zu 43% gehemmt werden. Die nicht vollständige Inhibierung der Proliferation könnte auf eine zu geringe Serumkonzentration zurückzuführen sein. Diese wurde jedoch gewählt, um zu verhindern, daß das Antiserum bei höheren Konzentrationen mit Protein I ein

Immunpräzipitat bildet und das Mitogen somit den Zellen entzogen wird. Um das Verhältnis von Mitogenkonzentration zu Antiserumkonzentration zu optimieren, wären weitere Experimente nötig. Bei der Hemmung der Stimulation durch CNBr 1 wurden verschiedene Proteinkonzentrationen bei konstanter Serumkonzentration (o,1%) untersucht. Die Stimulation mit CNBr 1 konnte durch ein Maus-Anti-Protein I-Serum und ein Maus-Anti-CNBr 1-Serum in gleicher Weise gehemmt werden (Abb. 12). Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß durch die CNBr-Spaltung von Protein I die antigenen Determinanten im CNBr 1-Fragment nicht verändert worden sind.

Um zu klären, welche Zellpopulationen für die mitogene Stimulation durch die beschriebenen Substanzen benötigt werden, wurden Experimente mit Milzzellen aus nackten Mäusen, mit Thymozyten und mit getrennten Milzzell-Populationen durchgeführt.

Die Induktion der Proliferation von Milzzellen aus nackten Mäusen durch Protein I und CNBr 1 (Abb. 13) liefert einen ersten Anhaltspunkt dafür, daß beide Substanzen B-Zell-Mitogene sind und daß ihre mitogene Aktivität nicht von der Anwesenheit funktioneller T-Lymphozyten abhängt. Ersteres wird dadurch bestätigt, daß weder Protein I noch CNBr 1 irgendeinen Einfluß auf die Proliferation von Thymozyten haben (Abb. 14).

Weiterhin wurde der Einfluß von adhärenten Zellen auf die mitogene Stimulation untersucht. Bereits 1967 hat Mosier beschrieben (59), daß sowohl eine an Plastik-Petrischalen adhärente Zellpopulation,als auch eine nicht adhärente Zellpopulation aus Milzzellen zur Antikörperproduktion benötigt werden. Eine einmalige Adhärenz an Plastik-Petrischalen über 3o Minuten führte zu einer Reduktion der plaquebildenden Zellen um über 9o% (59). Durch Zumischen von adhärenten Zellen zu den Überständen aus nicht adhärenten Zellen konnte die Zahl der antikörpersezernierenden Zellen bis auf etwa 8o% des ursprünglichen Wertes wieder erhöht werden.

In dieser Arbeit wurde nicht die Differenzierung, sondern die Proliferation nach Entfernen von adhärenten Zellen untersucht. Dabei ergab sowohl für Protein I als auch für Con A eine einmalige Adhärenz an Plastik-Petrischalen über 45 Minuten eine Erhöhung der Proliferationsrate, erst nach zweimaliger bzw. dreimaliger Adhärenz konnte diese reduziert werden (Abb. 15 und 16). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß durch einmalige Adhärenz an Plastik eine suprimierende Zellpopulation (Makrophagen) entfernt wird (1o1). Außerdem können durch das Einstellen der nicht adhärenten Zellen auf gleiche Zellzahlen ($3{,}3 \times 1o^6$/ml) prozentual mehr stimulierbare Zellen erfaßt werden.
Die Tatsache, daß mit der beschriebenen Methode (2.4.1.5.1.) aus einer Milzzell-Population 44,2% adhärente Zellen entfernt werden können (Tabelle 6), stimmt mit den Angaben von Mosier (59) überein. Durch nachträgliches Zumischen von adhärenten Zellen zu einer nicht adhärenten Zellpopulation (Abb. 17 und 18) konnte die Proliferationsrate ebenfalls auf den ursprünglichen Wert für eine normale Milzzell-Population bzw. einen höheren Wert gesteigert werden (Vergl. Mosier, 59).
Von Ly und Mishell (6o) wurde 1974 eine Methode zur Abtrennung von adhärenten Zellen und von antikörperproduzierenden B-Lymphozyten aus einer Milzzell-Population durch Passage über eine Sephadex G 1o Säule beschrieben. Mit Hilfe eines hämolytischen Plaque-Tests konnte festgestellt werden, daß auf diese Weise über 9o% der antikörperproduzierenden Zellen durch Adhärenz entfernt werden und Vorläufer B-Lymphozyten und T-Lymphozyten aus dem Eluat gewonnen werden können (6o). Um zu prüfen, ob die an Sephadex G 1o bindenden Zellpopulationen zur Stimulation mit Protein I und Con A benötigt werden, wurden im Anschluß an eine Zelltrennung über Sephadex G 1o Stimulationsexperimente durchgeführt (Abb. 19 und 2o). Das Fehlen der an Sephadex G 1o bindenden Zellen verringerte die durch Protein I induzierte Proliferation

um etwa 5o%. Das vollständige Ausbleiben einer Proliferation konnte jedoch erst durch zusätzliche Zelladhärenz an Plastik-Petrischalen erreicht werden (Abb. 21 und 22). Die erhaltenen Zellausbeuten bei der Trennung von Milzzellen über Sephadex G 1o stimmen mit den Ergebnissen von Ly und Mishell (6o) überein (Vergl. Tabelle 7).
Um genauere Erkenntnisse darüber zu erhalten, welche Zellpopulationen (B-Lymphozyten oder T-Lymphozyten) durch Protein I zur Proliferation stimulierbar sind, wurden Milzzellen nach 3 verschiedenen Methoden in B-Zell- und T-Zell-Populationen getrennt. Die Arbeitsgruppe von N. Sharon (61) konnte ein ausschließliches Verklumpen von B-Lymphozyten mit Sojabohnen-Agglutinin nachweisen. T-Lymphozyten waren davon nicht betroffen. Diese Erkenntnis wurde bei der Trennung von Milzzellen zur Untersuchung der Stimulierbarkeit der erhaltenen Zellpopulationen angewandt. Laut Reisner et al. (61) sollten 41,5% einer nicht agglutinierten Zellpopulation (T-Lymphozyten) und 18% einer agglutinierten Zellpopulation (B-Lymphozyten) erhalten werden. Diese Ergebnisse wurden nicht bestätigt; es konnten bis zu 43% B-Lymphozyten und bis zu 19% T-Lymphozyten erhalten werden (Vergl. Tabelle 8). Die auf diese Weise erhaltene B-Zell-Population ist durch Protein I stimulierbar (Abb. 23), ebenfalls die erhaltene T-Zell-Population, letztere hat jedoch eine wesentlich geringere Proliferationsrate. Eine Erklärung für diese Ergebnisse wäre eine nicht quantitativ verlaufene Trennung von B- und T-Lymphozyten mit Hilfe von Sojabohnen-Agglutinin.
Die Trennung von B- und T-Lymphozyten mit Anti-Theta- bzw. Anti-Immunoglobulinseren und Komplement verlief ebenfalls nicht zufriedenstellend (Vergl. 2.4.1.6.1.). Sowohl eine normale Milzzellpopulation als auch eine mit Anti-Theta-Serum und Komplement behandelte Milzzell-Population konnten mit Protein I stimuliert werden, eine mit Anti-Maus-Immunoglobulin-Serum und Komplement behandelte Milzzell-

population dagegen nicht. Die Trennung in B- und T-Lymphozyten wurde mit einem FITC-markierten Anti-Maus-Immunoglobulin-Serum (Vergl. 2.2.9. und 2.2.1o.) überprüft. Dabei konnten in der T-Zell-Population keine fluoreszierenden Zellen mehr gefunden werden. Es bestehen jedoch Anhaltspunkte dafür (S. Köhl, persönliche Mitteilung), daß das verwendete Anti-Maus-Immunoglobulin-Serum auf Balb/c Milzzellen toxische Wirkung hat und somit die Zelltrennung mit Hilfe dieses Serums in Frage gestellt werden muß.
Eine dritte Möglichkeit zur Trennung von B- und T-Lymphozyten war die Passage von Milzzellen über eine Nylon-Wolle-Säule (62). Dies führte zu gut reproduzierbaren Ergebnissen. Die erhaltenen Zellausbeuten entsprechen den Angaben von Henry et al. (62). Es konnte gezeigt werden, daß normale Milzzellen und B-Lymphozyten mit Protein I stimulierbar sind, T-Lymphozyten dagegen nicht (Abb. 24). Die Tatsache, daß jedoch alle drei Zellpopulationen mit Con A stimulierbar waren (Abb. 25), läßt einerseits auf eine nicht quantitativ erfolgte Trennung von B- und T-Lymphozyten schließen. Andererseits konnte von S. Köhl (persönliche Mitteilung) gezeigt werden, daß eine Zellpopulation, die nur zu einem sehr geringen Prozentsatz T-Lymphozyten enthält, bereits nach 24 Stunden Inkubationszeit wieder mit Con A stimulierbar ist, nach 48 Stunden unterscheidet sich die Stimulation dieser Zellpopulation nicht mehr von der einer normalen Milzzell-Population. Es wurden außerdem funktionelle T-Lymphozyten beschrieben, die ebenfalls an Nylon-Wolle adhärieren (62). Das könnte die Stimulierbarkeit der adhärenten Zellpopulation mit Con A erklären.

Weiterhin wurde untersucht, ob Protein I und seine Fragmente in der Lage sind, die Antikörpersekretion von B-Lymphozyten zu induzieren. Wie bei den beschriebenen Stimulationsexperimenten (Proliferation), mußte zunächst die optimale Stimualtionszeit für die Antikörpersynthese ermittelt werden (Abb. 26). Ein Optimum von 3 Tagen

Stimulation für CNBr 1 und Protein I wurde auch bei in vivo Stimulationsexperimenten (S. Köhl, 89) ermittelt. Bei den Dosis-Wirkungskurven (Abb. 27 und 28) kommt wie bei den bereits diskutierten Stimulationsexperimenten klar zum Ausdruck, daß CNBr 1 und Protein I vergleichbare stimulierende Eigenschaften haben, wogegen eine Mischung der niedermolekularen CNBr-Fragmente von Protein I Milzzellen nicht zur Antikörperproduktion stimulieren kann. Das kann als weiterer Beweis für die mitogenen Eigenschaften von Protein I und CNBr 1 auf B-Lymphozyten angesehen werden. Aus den Abbildungen 29,3o und 31 kann man entnehmen, daß beide Mitogene in vivo eine Milzvergrößerung und Antikörpersekretion verursachen. Allerdings ist bei gleichen Dosen die stimulierende Wirkung von Protein I größer als die von CNBr 1.

Der Mechanismus der Aktivierung von B-Lymphozyten durch Mitogene ist noch unbekannt. Für LPS wird ein spezifischer Membranrezeptor auf B-Lymphozyten postuliert (1o2,1o3). Außerdem nimmt man an, daß der Lipidteil von LPS und Lipoprotein für die Mitogenität verantwortlich ist (97). H. Scheuer (1o6) konnte die Bindeproteine auf Lymphozyten für freies Lipoprotein identifizieren, wobei die Proteine des H-2-Locus des Histokompatibilitätskomplexes (H-2D-, H-2K- und Ia-Antigene) sich als Bindungsstellen erwiesen. Außerdem wurde nachgewiesen (1o6), daß die Bindung von Lipoprotein an Lymphozyten saturierbar, zeitabhängig, dosisabhängig und reversibel ist. Diese Daten unterstützen die Theorie, daß die mitogene Aktivierung von B-Lymphozyten durch Wechselwirkungen der mitogenen Substanzen mit spezifischen Rezeptoren auf der Lymphozytenmembran zustande kommt. Da weder Protein I noch CNBr 1 einen Lipidanteil besitzen, muß ihre Bindung an B-Lymphozyten von anderer Natur sein. Wahrscheinlich könnten Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Protein oder die Untersuchung der Enzymaktivität von Membrankomponenten während der Stimulation durch diese Mitogene weiter zur Klärung des Mechanismus der mitogenen Aktivierung von B-Lymphozyten beitragen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Protein I aus der äußeren Membran von Escherichia coli 8/r wurde mit verschiedenen Methoden isoliert und gereinigt. Es wurde eine Möglichkeit gefunden, das Protein in größeren Mengen in reiner Form zu gewinnen und zu analysieren. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, konnte für Protein I ein durchschnittliches Molekulargewicht von 35.8oo ermittelt werden, und es wurde durch Spaltung mit CNBr in vier Fragmente zerlegt.
Die biologischen Eigenschaften eines dieser Fragmente (MW 21.5oo) sowie die biologischen Eigenschaften von Protein I wurden durch Stimulationsexperimente mit Milzlymphozyten verschiedener Mäusestämme untersucht. Die Stimulation wurde durch Einbau von ^{3}H-markiertem Thymidin in die DNA der Milzzellen gemessen. Dabei erreichte bei beiden Substanzen die mitogene Stimulation nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden ihr Maximum. Milzzellen aus C3H/HeJ-Mäusen und Balb/c-Mäusen sind sowohl mit Protein I als auch mit CNBr 1 (CNBr-Fragment von Protein I mit einem MW von 21.5oo) in vergleichbarer Weise stimulierbar. Das Optimum der Dosis-Wirkungskurven beider Substanzen lag bei einer Proteinkonzentration von 13o - 15o ug/ml. Die kleineren CNBr-Fragmente von Protein I zeigten keine stimulierende Wirkung auf Milzlymphozyten.
Auch bei der Untersuchung der RNA-Synthese durch ^{3}H-Uridin-Einbau und der Proteinbiosynthese durch ^{3}H-Leucin-Einbau wurden für Protein I und CNBr 1 vergleichbare Ergebnisse erhalten. Außerdem konnte die Stimulation von CNBr 1 sowohl durch Zugabe eines Maus-anti-Protein I-Serums als auch eines Maus-anti-CNBr 1-Serums gehemmt werden.

Protein I und CNBr 1 sind B-Zell-Mitogene. Sie stimulieren Lymphozyten aus nackten Mäusen und haben keinen Einfluß auf Thymozyten. Zur Stimulation werden jedoch an Plastik adhärente Zellpopulationen und an Sephadex G 1o adhärente Zellpopulationen benötigt. Durch Abtrennung dieser adhärenten Zellpopulationen aus Milzzellsuspensionen erhält man mit den genannten Proteinen eine stark reduzierte Immunantwort, die durch nachträgliches Zumischen von 1o % (Endkonzentration) adhärenter Zellen wieder erhöht werden kann.

Weitere Hinweise für die Aktivierung von B-Lymphozyten durch die untersuchten Substanzen, konnten aus Experimenten mit getrennten Lymphozytenpopulationen erhalten werden. Dabei wurden die Milzzellpopulationen mit Hilfe von Sojabohnen-Agglutinin oder mit Hilfe einer Nylonwolle-Säule getrennt.

Zusätzlich wurde die Induktion einer Antikörpersynthese nach Inkubation mit Protein I oder CNBr 1 untersucht. Eine optimale Antikörpersyntheserate konnte nach einer in vitro Stimulation von 3 - 4 Tagen erhalten werden. Eine in vivo Stimulation mit 35 ug Protein pro Maus ergab für Protein I und CNBr 1 eine Erhöhung der Milzgewichte und eine entsprechende Erhöhung der Anzahl antikörpersezernierender Zellen. Ebenfalls vergleichbar ist die Proliferationsrate der in vivo stimulierten Milzzellen.

Die biologischen Eigenschaften des Spaltstücks CNBr 1 von Protein I und die Wirkung von Protein I auf Lymphozyten verschiedener Mäusestämme sind vergleichbar. Dies läßt den Schluß zu, daß das CNBr 1-Fragment die für die Mitogenität verantwortliche Strukturkomponente des Protein I-Moleküls darstellt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Strasburger, E., (1971)
Lehrbuch der Botanik, G. Fischer Verlag, Stuttgart

2. Singer, S.J.J., Nicolson, G.L., (1972):
Science 175, 72o-731

3. Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E., Carson, J. (1972): J. Biol. Chem. 247, 3962-3972

4. Smit, J., Kamio, Y., Nikaido, H. (1975):
J. Bacteriol. 124, 942-958

5. Di Rienzo, J.M., Nakamura, K., Inouye, M. (1978):
The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions.
Ann. Rev. Biochem. 47, 481-532

6. Rosenbusch, J.P. (1974): Characterization of the major envelope protein from Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 249, 8o19-8o29

7. Chen, R., Krämer, C., Schidmayr, W., Henning, U. (1979):
Primary structure of major outer membrane Protein I of Escherichia coli B/r.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76, 1o, 5o14-5o17

8. Inouye, M., Yee, M. (1973): Homogeneity of envelope proteins of Escherichia coli separated by gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate.
J. Bacteriol. 113, 3o4-312

9. Schnaitman, C.A. (1974): Outer membrane proteins of E. coli.III. Evidence that the major protein of E. coli O111 outer membrane consists of four distinct polypeptide species. J. Bacteriol. 118, 442-453

1o. Bragg, P.D., Hou, C. (1972): Organization of proteins in the native and reformed outer membrane of Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 274, 478-488

11. Uemura, J., Mizushima, S. (1975): Isolation of outer membrane proteins of Escherichia coli and their characterization on polyacrylamid gel.
Biochim. Biophys. Acta 413, 163-176

12. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., Van der Hock, P., Van Alphen, L. (1975): Electrophoretic resolution of the "Major outer membrane protein" of Escherichia coli K 12 into four bands.
FEBS Lett. 58, 254-258

13. Braun, V., Rehm, K. (1969): Chemical characterization, spectral distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the Escherichia coli cell wall.
Eur. J. Biochem. 1o, 426-438

14. Braun, V., Wolff, H. (197o): The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of Escherichia coli.
Eur. J. Biochem. 14, 387-391

15. Braun, V., Bosch, V. (1972): Sequence of the murein-lipoprotein and the attachment site of the lipid.
Eur. J. Biochem. 28, 51-69

16. Hantke, K., Braun, V. (1973): Covalent binding of lipid to protein.
Eur. J. Biochem. 34, 284-296

17. Braun, V. (1975): Covalent lipoprotein from the outer membrane of Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 415, 335-377

18. Halegoua, S., Hirashima, A., Inouye, M. (1974): Existence of a free form of a specific membrane lipoprotein in gram negative bacteria. J. Bacteriol. 12o, 12o4-12o8

19. Steven, A.C., Ten Heggeler, B., Müller, R., Kistler, J., Rosenbusch, J.P. (1977): J. Cell. Biol. 72, 292-3o1

2o. Yu, F., Ichihara, S., Mizushima, S. (1979): A major outer membrane protein (O-8) of Escherichia coli K 12 exists as a trimer in sodium dodecyl sulfate solution. FEBS Lett. 1oo, 1, 71-74

21. Palva, E.T., Randall, L.L. (1978): Arrangement of Protein I in Escherichia coli outer membrane: Cross-linking study. J. of Bacteriol. 133, 1, 279-286

22. Nakae, T., Ishii, J., Tokunaga, M. (1979): Subunit structure of functional porin oligomers that form permeability channels in the outer membrane of Escherichia coli. The J. of Biol. Chem. 254, 5, 1457-1461

23. Bessler, W.G. (1981): Abwehrmechanismen gegen bakterielle Infektionen. Biologie in unserer Zeit, Verlag Chemie, Weinheim

24. Keller, R. (1977): Immunologie und Immunpathologie G. Thieme Verlag, Stuttgart

25. Lohmann-Matthes, M.L. (1981): Der Makrophage Biologie in unserer Zeit, Verlag Chemie, Weinheim

26. Harboe, M., Natvig, J.B. (1981): Medizinische Immunologie. F. Enke Verlag, Stuttgart

27. Unanue, E.R. (1978): The regulation of lymphocyte functions by the macrophage.
Immunol. Rev. 4o, 227-255

28. Mitchison, N.A. (1969): The immunogenic capacity of antigen taken up by peritoneal exudate cells.
Immunology 16, 1-14

29. Schmidtke, J. R., Unanue, E.R. (1971): Macrophage-antigen interaction: uptake, metabolism, and immunogenicity of foreign albumin.
J. Immunol. 1o7, 331-338

3o. Spitznagel, J.K., Allison, A.C. (197o): Mode of action of adjuvants: effects of antibody responses to macrophage-assoziated bovine serum albumin.
J. Immunol. 1o4, 128-139

31. Mizel, S.B. (1982): Interleukin 1 and T cell activation.
Immunol. Rev. 63, 51-72

32. Aarden, L.A. et al. (1979): Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors (Letter to the editor).
J. Immunol. 123, 2928

33. Farrar, J.J., Mizel, S.B., Fuller-Bonar, J., Hilfike, M.L., Farrar, W.L. (198o): Lipopolysaccharide-mediated adjuvanticity: effect of lipopolysaccharide on the production of T-cell growth factor (interleukin 2).
In Microbiology 198o, ed. Schlessinger, D., p 36, Amer. Soc. Microbiology, Wash. D.C.

34. Larsson, E.L., Iscove, N.N., Coutinho, A. (198o): Two distinct factors are required for induction of T cell growth. Nature 283, 664

35. Smith, K.A., Gilbride, K.J., Favata, M.F. (198o): Lymphocyte activating factor promotes T cell growth factor production by cloned murine lymphoma cells. Nature, 287, 353

36. Farrar, J.J., Benjamin, W.R., Hilfiker, M.L., Howard, M., Farrar, W.L., Fuller-Farrar, J. (1982): The biochemistry, biology, and role of Interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. Immunol. Rev. 63, 129-166

37. Watson, J., Mochizuki, D., Gillis, S. (198o): T-cell growth factors: interleukin 2 Immunology today 1, 6, 113-116

38. Moore, R.N., Hoffeld, J.T., Farrar, J.J., Mergenhagen, S.E., Oppenheim, J.J., Shadduck, R.K. (1981): Role of colony stimulating factors as primary regulators of macrophage functions. Lymphokines 3, 119

39. Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Paul, W.E. (1982): Identification of a T-cell derived B-cell growth factor distinct from Interleukin 2. In press.

4o. Schimpl, A., Hühner, L., Wong, C.A., Wecker, E. (198o): Distinction between T helper cell replacing factor (TRF) and T cell growth factor (TCGF). Behring Inst. Mitt. 76, 221

41. Jerne, N.K. (1971): The somatic generation of immune recognition. Eur. J. Immunol. 1, 1 - 9

42. Melchers, F., Andersson, J., Lernhardt, W., Schreier, M. (1980): Roles of surface-bond immunoglobulin molecules in regulating the replication and maturation to immunoglobulin secretion of B-Lymphocytes.
Immunol. Rev. 52, 89-114

43. Kabat, E.A. (1980): Origins of antibody complementary and specificity - hypervariable regions and the minigene hypothesis.
The J. of Immunol. 125, 3, 961-969

44. Dziarski, R. (1981): Studies on the mechanism of peptidoglycan- and lipopolysaccharide-induced polyclonal activation.
Infection and Immunity 35, 2, 507-514

45. Andersson, J., Coutinho, A., Melchers, F. (1977): Frequencies of mitogen-reactive B-cells in the mouse. I. Distribution in different lymphoid organs from different inbred strains of mice at different ages.
J. Exp. Med. 145, 1511

46. Andersson, J., Coutinho, A., Melchers, F. (1978): The switch from Ig M to Ig G secretion in single mitogen-stimulated B cell clones.
J. Exp. Med. 147, 1744

47. Oppenheim, J.J., Rosenstreich, D.L. (1976): Mitogens in Immunobiology, Academic Press Inc. New York

48. Caldwell, H.D., Kromhout, J., Schachter, J. (1981): Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis
Inf. and Immun. 31, 3, 1161-1176

49. Hindennach, I., Henning, U. (1975): The major proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane. Preparative isolation of all major membrane proteins. Eur. J. Biochem. 59, 207-213

50. Oakley, B.R., Kirsch, D.R., Morris, N.R. (1980): A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamid gels. Analyt. Biochem. 105, 361-363

51. Morney, J.H. (1981): Silver stain for proteins in polyacrylamid gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Analyt. Biochem. 117, 307-310

52. Hayashi, K. (1975): A rapid determination of sodium dodecylsulfate with Methylene Blue. Analyt. Biochem. 67, 503-506

53. Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72, 248-254

54. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 Nature 227, 680

55. O'Farrell, P.H. (1975): High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 10

56. Weber, K., Osborn, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406

57. de St. Groth, S.F., Webster, R.G., Datyner, A. (1963): Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. Biochim. Biophys. Acta, 71, 377-391

58. Leon, M.A. (1974): Modification of the biological activities of Concanavalin A by Anti-Concanavalin A. Advances in Exp. Med. and Biol. 55, 261-271

59. Mosier, D.F. (1967): A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. Science 158, 1573

6o. Ly, I.A., Mishell, R.I. (1974): Separation of mouse spleen cells by passage through columns of Sephadex G 1o. J. of Immunol. Meth. 5, 239-247

61. Reisner, Y., Ravid, A., Sharon, N. (1976): Use of soybean agglutinin for the separation of mouse B- and T-lymphocytes Biochem. and Biophys. Res. Comm. 72, 4, 1585-159o

62. Henry, C., Chen, Y.U., Stout, R., Swain, S.L. (1976): Nylon Wool, In: Selected methods in cellular immunology ed. by B.B. Mishell and St.M. Shiigi

63. Ouchterlony, Ö. (1948): In: Progress in Allergy, 1

64. Mancini, Carbonara, Heremans (1965): Immunochemistry 2, 235-254

65. Deppert, W., Walter, G. (1976): Simian virus (SV 4o) tumor-specific proteins in nucleus and plasma membrane of HeLa cells infected by adenovirus 2-SV 4o hybrid virus $Ad2^{+}ND2$. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 7, 25o5-25o9

66. Amante, L.A., Ancona, A., Forni, L. (1972): Conjugation of immunoglobulins with tetramethylrhodamine isothiocyanate.
J. immunol. Meth. 1, 289

67. Goding, J.W. (1976): Conjugation of antibodies with fluorochromes. Modification to the standard methods.
J. immunol. Meth. 13, 215

68. Goldman, M. (1968): Labeling agents and procedures of conjugations. In: M. Goldman, Fluorescence Antibody Methods, Academic Press, New York

69. Henning, R., Lange-Mutschler, J., Deppert, W. (198o): SV 4o transformed cells express SV 4o T-Antigen related antigens on the cell surface.
In Press

7o. Braun, V. (1975): Covalent lipoprotein from the outer membrane of Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 415, 335-377

71. Chen, R., Hindennach, I., Henning, U. (1978): Major proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane. Sequence of the cyanogen bromide fragments of Protein I from Escherichia coli B/r.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 18o7-181o

72. Gamon, K., Chen, R., Henning, U. (1978): Major proteins of the outer cell envelope membrane of Escherichia coli K 12. Multiple species of Protein I differ in primary structure.
Molec. gen. Genet. 166, 187-192

73. Schroeder, W.A., Shelton, J.B., Shelton, J.R. (1969): An examination of conditions for the cleavage of polypeptide chains with cyanogen bromide: Application to catalase.
Arch. of Biochem. and Biophys. 13o, 551-556

74. Gross, E., Witkop, B. (1962): Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: The methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease.
The J. of Biol. Chem. 237, 6, 1856-186o

75. Bargetzi, J.P., Thompson, E.O.P., Kumar, K.S.V., Walsh, K.A., Neurath, H. (1964): The amino- and carboxyl-terminal residues and the self-digestion of bovine pancreatic carboxypeptidase A.
The J. of Biol. Chem. 239, 11, 3767-3774

76. Dixon, H.B.F., Perham, R.N. (1968): Reversible blocking of amino groups with citaconic anhydride.
Biochem. J. 1o5, 312-314

77. Julius, M.H., Simpson, E., Herzenberg, L.A. (1973): A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 3, 645

78. Jerne, N.K., Nordin, A.A. (1963): Plaque formation in agar by single antibody-producing cell.
Science 14o, 4o5

79. Rittenberg, M.B., Pratt, K.L. (1969): Trinitrophenyl plaque-assay primary response of Balb/c mice to soluble and particulate immunogen.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132, 575-581

8o. Lehninger, A.L. (1975): Biochemistry
Worth Publishers, INC.

81. Franze, R. (1982):
Doktorarbeit, BFA Tübingen

82. Gronowicz, E., Coutinho, A., Melchers, F. (1976):
A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class.
Eur. J. Immunol. 6, 588-590

83. Sultzer, B. (1968): Genetic control of leucocyte responses to endotoxin.
Nature 219, 1253-1254

84. Verghese, M.W., Snyderman, R. (1982): Endotoxin (LPS) stimulates in vitro migration of macrophages from LPS-resistent mice but not from LPS-sensitive mice.
The J. of Immunol. 128, 2, 608-613

85. Weber, T.H., Skoog, V.T., Mattson, A., Lindahl-Kiessling, K. (1974): Kinetics of lymphocyte stimulation in vitro by non-specific mitogens.
Exp. Cell-Res. 85, 351-361

86. Younkin, L.H. (1972): In vitro response of lymphocytes to phytohemagglutinin (PHA) as studied with antiserum to PHA.
Exp. Cell-Res. 75, 1-10

87. Wortis, H.H. (1974): Immunological studies of nude mice.
Contemp. Topics Immunobiol. 3, 243

88. Stobo, J.D. (1972): PHA and Con A: Probes for murine T cell activation and differentiation.
Transplant. Rev. 11, 60-86

89. Köhl, S. (1983): Doktorarbeit, Tübingen

90. Garten, W. (1974): Isolierung und Charakterisierung integraler Proteine der äußeren Membran von Escherichia coli
Doktorarbeit, Tübingen

91. Schmitges, C.J., Henning, U. (1976): The major protein of the Escherichia coli outer cell-envelope membrane. Heterogeneity of Protein I.
Eur. J. Biochem. 63, 47-52

92. Goldman, R.C., White, D., Leive, L. (1981): Identification of outer membrane proteins, including known lymphocyte mitogens, as the endotoxin protein of Escherichia coli O111.
The J. of Immunol. 127, 4,

93. Cunningham, B.A., Sela, B., Yahara, I., Edelman, G.M. (1975): Structure and activities of lymphocyte mitogens In: Mitogens in Immunobiology 13-31 (J.J. Oppenheim and D.L. Rosenstreich eds.) Acad. Press, New York

94. Sharon, N. (1976): Lectins as Mitogens In: Mitogens in Immunobiology 31-41 (J.J. Oppenheim and D.L. Rosenstreich eds.) Acad. Press New York

95. Haas, I. (1979): Untersuchungen zur mitogenen Aktivität von freiem Lipoprotein aus der äußeren Membran von Escherichia coli
Doktorarbeit, Tübingen

96. Bessler, W.G., Resch, K., Hancock, E., Hantke, K. (1977) Induction of lymphocyte proliferation and membrane changes by lipopeptide derivatives from the outer membrane of Escherichia coli
Biochem. and Biophys. Res. Comm. 76, 239-246

97. Andersson, J., Melchers, F., Galanos, C., Lüderlitz, O. (1973): The mitogenic effect of lipopolysaccharide on bone marrow-derived mouse lymphocytes. Lipid A as the mitogenic part of the molecule.
J. Exp. Med. 137, 943-953

98. Sultzer, B.M. (1972): PPD Tuberculin - a B cell mitogen
Nature New Biology 24o, 198-2oo

99. Andersson, J., Lernhardt, W., Melchers, F. (1979): The purified protein derivative of tuberculin, a B-cell mitogen that distinguishes in its action resting small B-cells from activated B-cell blasts.
J. Exp. Med. 15o, 1339-135o

1oo. Bessler, W.G., Henning, U. (1979): Protein I and Protein II^+ from the outer membrane of Escherichia coli are mouse B-lymphocyte mitogens.
Z. Immun. Forsch. 155, 387-398

1o1. Lichtenstein, A., Murahata, R., Terpenning, M., Cantrell, J., Zighelboim, J. (1981): Activation and mechanism of action of suppressor macrophages.
Cell. Immunol. 64, 15o-161

1o2. Forni, L., Coutinho, A. (1978): An antiserum which recognizes lipopolysaccharide-reactive B-cells in the mouse.
Eur. J. Immunol. 8, 56-61

1o3. Coutinho, A., Forni, L., Watanabe, T. (1978): Genetic and functional characterization of an anti-serum to the lipid A-specific triggering receptor on murine B-lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 8, 62-67

1o4. C. Verhoef, B. Lugtenberg, R. van Boxtel, P. de Graaff, H. Verheij, 1979:
Genetics and biochemistry of the peptidoglycan-associated proteins b and c of Escherichia coli K 12
Molec. gen. Genet. 169, 137-146

1o5. R. Chen, C. Krämer, W. Schmidmayr, U. Chen-Schmeisser, U. Henning, 1982:
Primary structure of major outer-membrane protein I (omp F protein, porin) of Escherichia coli B/r
Biochem. J. 2o3, 33-43

1o6. W. Scheuer, 1983:
B-Lymphozytenaktivierung durch Lipoprotein aus Escherichia coli und synthetische Analoga
Dissertation an der Universität Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Allenstein, D. Baron, H. Beier, W. Bessler, V. Braun, K. Bredereck, E. Fluck, D. Hülser, O.G. Issinger, K. Jeremias, K. Köhler, U. Kull, P. Kunze, H.Ch. Mailänder, D. Müller, K.W. Mundry, G. Pfleiderer, M. Wabl, A. Wagner und S. Weiss.

Lebenslauf

	Karin Brigitte Stäb, geb. Mieth geboren am 25. Juni 1955 in Stuttgart
April 1962 - März 1966	Besuch der Grundschule in Stuttgart
April 1966 - Juli 1971	Besuch der Realschule in Stuttgart-Rot
12. Juli 1971	Mittlere Reifeprüfung
Sept. 1971 - Juni 1974	Besuch des dreijährigen Wirtschaftsgymnasiums in Stuttgart-Ost
15. Juni 1974	Reifeprüfung
Okt. 1974 - Juni 1980	Studium der Biologie an der Universität Stuttgart und der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien
Juni 1978 - Jan. 1980	Diplomarbeit und Zulassungsarbeit in der Abteilung Zoologie der Universität Stuttgart
30. Mai 1980	Zeugnis über die Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien
3. Juni 1980	Diplomzeugnis
Mai 1980 - Nov. 1980	Arbeit an der Universität Ulm als wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung Biochemie
Jan. 1981 - März 1983	Erstellung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. W.G. Bessler
10. Dez. 1982	Heirat mit Franz Stäb, Diplombiologe